

Etude Des Effets Des Régulateurs De Croissance Sur Les Stades De Prolifération Et De Développement De La Pomme De Terre (*Solanum Tuberosum. L*) In Vitro

Sadek Chahredine, (PhD)

Genetics, Biochemistry & Plant Biotechnology Laboratory, University
Mentouri Constantine 1, Algeria

Department of Ecology and Agronomy, University of Jijel, Algeria

Nadia Ykhlef, (Pr)

Genetics, Biochemistry & Plant Biotechnology Laboratory, University
Mentouri Constantine 1, Algeria

doi: 10.19044/esj.2017.v13n24p145 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n24p145](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2017.v13n24p145)

Abstract

The aim of this study is to determine the effects of different concentrations and combinations of the phytohormones, 1-naphthaleneacetic acid (NAA), and 6-benzylaminopurine (BAP): M1 (0.5 mg / l + 1 mg / l), M2 (1 mg / l + 0.5 mg / l) , M3 (2 mg / l + 2 mg / l), M4 (0.5 mg / l + 1 mg / l, NAA), M5 (1.0 mg / l + 1 mg / l , NAA), and M6 (2.0 mg / l + 1 mg / l, NAA). This study was carried out in dark condition on callus induction of *potato plants (Solanum tuberosum L.)* cultivars from potato tuber bud so as to demonstrate the role of light. The callus initiation begins after 7 days of incubation for all studied media. After two months of incubation, the better development of callus was noted in Spunta variety by using medium M1, M2, M3, and M6. The calluses took a compact structure of brown-white color for both varieties with a callus induction rate of 20- 40%. This was collected with kondor variety for M2 and (M3, M4, M5) media respectively and 10-30% for M4 (M1, M2, M3) for Spunta variety also. The highest fresh weight was recorded on M2 medium with 0.26g for Kondor variety and 0.93g for Spunta variety.

Keywords: *Solanum tuberosum. L*, NAA, BAP

Résumé

Cette étude visait à déterminer les effets des différentes concentrations et combinaisons de phytohormones, d'acide 1-

naphtalèneacétique (NAA) et de 6-benzylaminopurine (BAP) additionées au milieu de Murashige et Skoog(M): M1 (0, 5 mg / l +1 mg / l), M2 (1 mg / l + 0,5 mg / l), M3 (2 mg / l +2 mg / l), M4 (0,5 mg / l + 1 mg / l, NAA), M5 (1,0 mg / l, NAA) et M6 (2,0 mg / l, NAA) , à l'obscurité sur l'induction du cal à partir des bourgeons de tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L) pour démontrer le rôle de la lumière. La callogenèse commence après 7 jours d'incubation pour tous les milieux étudiés, après deux mois d'incubation. Le développement meilleur des cals a été noté chez la variété Spunta avec les milieu M1, M2, M3 et M6. les cals prennent une structure compacte de couleur brun-blanc pour les deux variétés avec un taux de callogenèse de 20-40% avec kondor pour les milieux M2 et (M3, M4, M5) respectivement et de 10-30% pour M4 et (M1, M2, M3) pour Spunta respectivement. Le poids frais le plus élevé a été enregistré sur le milieu M2 avec 0.26 g pour la variété Kondor et 0 .93g pour la variété Spunta.

Mots-clés: Callogenèse, *Solanum tuberosum*.L, NAA, BAP

Introduction

La pomme de terre constitue une culture vivrière stratégique, elle occupe la quatrième production alimentaire dans le monde après les céréales: le blé, le riz et le maïs.

Les techniques de production de pomme de terre passent par la culture in vitro pour produire des plants sains. Le succès de la régénération des plantes à partir de tissus de cellules ou d'organes et l'une des étapes les plus importantes dans l'application des biotechnologies à l'amélioration des traits agronomiques y compris la qualité et la résistance au stress biotique et abiotique (Kowalska & Arseniuk, 2016).

Les conditions de réussite de la callogenèse de pomme de terre reposent sur la maîtrise de la composition du milieu de culture et des équilibres auxines cytokinine ainsi que les conditions d'incubations des explants tel que la lumière et la température.

La manipulation du rapport auxine/cytokinine peut conduire au développement d'une racine de bourgeons ou d'un embryon somatique à partir de laquelle une plante entière devrait être produite.

D'autre part la lumière est un facteur essentiel à la croissance par son intensité et sa qualité , le développement et la synthèse des pigments des plantes(Jang et al., 2013; Ngoc Ai et al., 2016).

La lumière joue un rôle important sur le développement des végétaux. Elle agit sur l'élongation des tiges, la morphologie des feuilles et leur teneur en pigments ; elle joue également un rôle déterminant dans l'induction florale. Selon Fuet al. (2012), la durée journalière d'éclairage

conditionne la croissance des tissus. D'autre par l'intensité d'éclairement est corrélé positivement avec la teneur en chlorophylle nombre de feuilles et la matière sèche (During & Harst,1996; Soontornchainaksaeng et al., 2001). La longueur d'onde influence aussi la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes, elle importante avec la couleur blanche et diminue respectivement avec le bleu et le rouge (Cybularz-Urban et al., 2007; UmmaHabiba et al., 2014).

Selon (Paniagua- Pardo et al., 2013; Syahirah Azmi, 2014; Schroter-Zakrzewska et al., 2014) la croissance des plantes est influencée par la longueur d'onde, en effet la longueur de l'hypocotylle, la croissance des racines et le poids sec des semences augmentent respectivement avec la couleur de la lumière vert et rouge ou bleu.

Selon (Pan & Guo, 2016; OuYang et al., 2015), la lumière par son intensité et ça qualité, joue un role primordiale dans la croissance , le développement et la production de metabolites secondaires.

La croissance et le développement ainsi que l'expression génétique des plantes est régulé par l'interaction entre le milieu (la lumière, l'eau et la gravité) et le programme interne de la plante, les plantes de l'obscurité se caractérisent par une photosynthèse réduit à cause des chloroplastes non développés, hypocotylle long et petites cotylédones accompagnés du non expression des gènes impliqués dans la photosynthèse et la synthèse des pigments (Chory et al.,1996). La forme du phytochrome (Pr et Pfr) oriente la croissance ainsi que l'absorption du potassium (Bartley &Frankland,1984).

Dans le présent travail nous avons envisagé l'action de l'obscurité sur la croissance des cals de deux variétés de pomme de terre à savoir Spunta et Kondor , induit par des auxines et des cytokinines NAA/BAP.

Matériels et Méthodes

Les tubercules de deux variétés Spunta et Kondor ont été mis à germer au laboratoire, à température ambiante et à l'obscurité. Au bout d'un mois, les germes ont été sectionnés à leur base (environ 0,5 cm de long) et désinfectés par trempage dans l'éthanol à 70% pendant 1 minute puis dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO à 0,5%) pendant 15 min, puis rincés dans 3 bains successifs d'eau distillée stérile pendant 5 min.

Ensuite, ils ont été transférés au milieu MS enrichis de NAA en combinaison avec BAP (NAA + PAB: M1 (0, 5 mg / l +1 mg / l), M2 (1 mg / l + 0,5 mg / l) et M3 (2 mg / l +2 mg / l) et NAA, M4 seul (0,5 mg / l), M5 (1,0 mg / l) et M6 (2,0 mg / l), additionné de 3% (w/v) saccharose et solidifié avec 0,8 % (w/v) agar.Les cultures ont été incubées à 25 ± 1 ° C dans l'obscurité en maintenant 60 à 70% d'humidité.

Variables Mesurées

Les paramètres mesurés au cours de cette étude sont les suivants:

-Estimation du poids frais : Le poids frais de chaque cal formé est exprimé en g par le calcul de la moyenne correspondante à chaque milieu, par la différence entre le poids des tubes de culture au début et à la fin d'incubation avec une balance sensible.

Taux de Callogenèse

Après huit semaines d'incubation, le taux de callogenèse a été calculé selon la formule suivante:

$$\text{Taux de callogenèse} = \frac{\text{Nombre d'explant produisant des cals}}{\text{Nombre d'explant cultivés}} \times 100$$

Description des phases de développement des explants : La description des stades de développements des cals a été réalisée par la notation de la durée de callogenèse, description de la forme et la texture des cals, comptage du nombre de jour pour le début de la callogenèse et estimation du degré de développement des cals par rapport aux différents milieux utilisés après 7, 15 et 60 jours d'incubation respectivement.

Analyse des Données

La collecte de données et l'analyse statistique. Les données ont été recueillies en comptant le nombre de morceaux de cal induit.

Le dispositif expérimental était un bloc plan factoriel randomisé avec trois répétitions, et les données ont été analysées par ordinateur en utilisant un logiciel statistique (programme Excel).

Résultats et Discussion

Etude de l'effet de l'obscurité sur les callogenèse après une semaine d'incubation

La réponse à la callogenèse des explants incubés à l'obscurité varie d'un milieu à l'autre, elle est précoce pour les milieux M2, M5 et M6, après une semaine d'incubation les cals obtenues sont de couleur blanc pour (M6 et M1), Brun pour (M2, M3 et M4) de structure friable et deviennent blanches avec émission des racines à la base des explants après quinze jours (Figure 01A, Tableau 01), pour tous les explants testés avec les deux variétés.

Selon Moitreyee et al. (2013) la texture et le type de cals ont été influencés par le type de régulateurs de croissance et les explants utilisés, quatre types.

Tableau 01. Description des phases de développement après 7 jours d'incubation des deux variétés Spunta et Kondor sur les différents milieux.

Milieux	Variétés	Après 7 jours	15 jours
M1 (MS+NAA+BAP) (0.5+1) mg/l	Spunta	Pas de réponse	Cals blancs et émission de racines sur toutes les explants
	Kondor	33% des explants Cal blanc jaune , 66% des explants Pas de cal et émission de racines	
M2 (MS+ NAA+BAP) (1 + 0.5) mg/l	Spunta	cal brun	
	Kondor	cal brun	
M3 (MS+ NAA/BAP) (2+2) mg/l	Spunta	Gonflement des cals bruns	
	Kondor	Cal brun	
M4 (MS+ NAA+BAP) (0.5+0) mg/l	Spunta	cal brun	
	Kondor	Début de cal brun	
M5 (MS+ NAA+BAP) (1+0) mg/l	Spunta	cal brun	
	Kondor	cal brun	
M6 (MS+ NAA/BAP) (2+0) mg/l	Spunta	Cal blanc	
	Kondor	Cal blanc	

Distincts de cals ont été obtenus à partir des explants de *Aquilaria Lam.* blanc, crème jaunâtre, noirâtre blanc et brun jaunâtre, des cals blanc friable et fragile a été obtenue lorsque les milieux MS sont supplémenté avec des concentrations élevées de 2,4-D et de faibles concentrations de Kinetin ont été utilisés et placés dans l'obscurité. Il est passé au vert dans les 2-3 semaines après le transfert à des conditions de lumière, d'autre part il a obtenu à l'obscurité avec le milieu MS complété par des concentrations élevées de NAA et faible de BAP, des cals jaune blanc à crème et des cals compacts.

Selon Lozzi et al. (2015) le transfert des cals obtenus au milieu dépourvu d'auxine chez le caroubier a permis le développement des structures embryonnaires globulaires, avec un maximum de 100 % dans le cas d'initiation en présence de 10 μ M de 2,4-D. L'effet inhibiteur de l'auxine sur le développement des embryons somatiques a été rapporté par plusieurs auteurs (Von Arnold et al., 2002; Pablo Manzur et al., 2014). Selon (George et al., 2008; Afshari & Kalantari, 2011) la callogenèse passe par trois étapes de développement: la première phase est l'induction de la division cellulaire, puis la dédifférenciation, qui est une période de division cellulaire active au cours de laquelle des cellules différenciées des explants perdent toute caractéristiques spécialisées enfin, la dernière étape est la période pendant laquelle la division cellulaire diminue ou cesse et la différenciation cellulaire augmente dans le cal.

Etude de l'effet de l'obscurité sur les callogenese après deux mois (germes)

Tableau 02. Description de la texture, couleur et degré de développement après 7 jours d'incubation des deux variétés Spunta et Kondor sur les différents milieux (MS+NAA et NAA/BAP).

Milieux	Structure des cals	Couleur des cals	Degré de développement des cals		Degré de developpement	
	Spunta et Kondor	Spunta et Kondor	Spunta	Kondor	Spunta	Kondor
M1	Compacte	Brun blanc	++++	+++	+++	+++
M2	Compacte	Brun blanc	++++	+++	+++	+++
M3	Compacte	Brun blanc	++++	+++	+++	+++
M4	Compacte	Brun blanc	++	++	++	++
M5	Compacte	Brun blanc	+++	+++	+++	+++
M6	Compacte	Brun blanc	++++	++++	++++	++++

Après deux mois d'incubation les cals prennent une structure compacte de couleur brun-blanc pour les deux variétés (Figure 01 CD, Tableau 02) avec un taux de callogenèse de (20- 40%) avec kondor pour les milieux M2 et (M3,M4,M5)respectivement et de (10-30%) pour M4 et (M1,M2,M3) pour Spunta respectivement, le développement meilleure été noté chez Spunta avec les milieu (M2,M3,M6).

Des résultats similaire de(Rahayu et al., 2016; Martin, 2004, et Elaleem et al., 2009), montrent que la morphologie des cals ainsi que leurs couleurs et texture sont fortement influencés par la concentration et le type d'auxine utilisés dans le milieu de culture.

Le poids frais moyen (0.38 g) des explants été meilleur avec Spunta avec les milieux (M1,M2 et M5) (Figure 02 ,Tableau 03), selon (Can et al., 2016) L'induction de la callogenèse , les taux de formation de bourgeons et le poids de cals ont également été significativement influencés par le type d'auxine et la concentrations des hormones de croissance.

Selon (Afshari & Kalantari, 2011) les auxines sont largement utilisées pour l'induction de cals. Les Auxines sont impliqués dans la division cellulaire, l'allongement des cellules, différenciation des tissus vasculaires, la rhizogenèse, la formation des racines, l'embryogenèse et l'inhibition de croissance axillaire de pousses. D'autre part la lumière contrôle la croissance des plantes et développement principalement de deux façons: la photosynthèse et la photomorphogénèse (Ascencio-Cabral et al., 2008).

La lumière avait un effet significatif sur la croissance des cals et leur morphogenèse, l'inhibition de la prolifération des pousses axillaires et l'induction de l'activité enzymatique spécifique qui concerne la formation de

certaines produits secondaires à base de glycoside flavonoïde (George et al., 2008).

Les résultats de Jabbar Taha et Mutasher (2017). sur *Citrullus colocynthis L.* ont montré une augmentation de la concentration de certains métabolites secondaires dans les extraits de cals, par traitement physique (lumières) et eliciters chimiques (ABA, CuSOR4R.5HR2RO).

Avec les faible taux de cytokinine / auxine de 0,004 et 0,02 la croissance des cals est seulement favorisée ou produit rarement de petites racines, des taux supérieurs de cytokinine / auxine de 0,1 à 5 en général donne des formation de racine améliorée. Au plus haut taux de cytokinin/auxin testé (5), les racines étaient extrêmement longues et minces.

La cytokinine influence le transport d'auxine cellulaire en cellule par modification de l'expression de plusieurs composants de transport d'auxine et module ainsi la distribution d'auxine importante pour la régulation de l'activité et la taille du méristème racinaire (Ru^oz^{ic}ka et al., 2009).

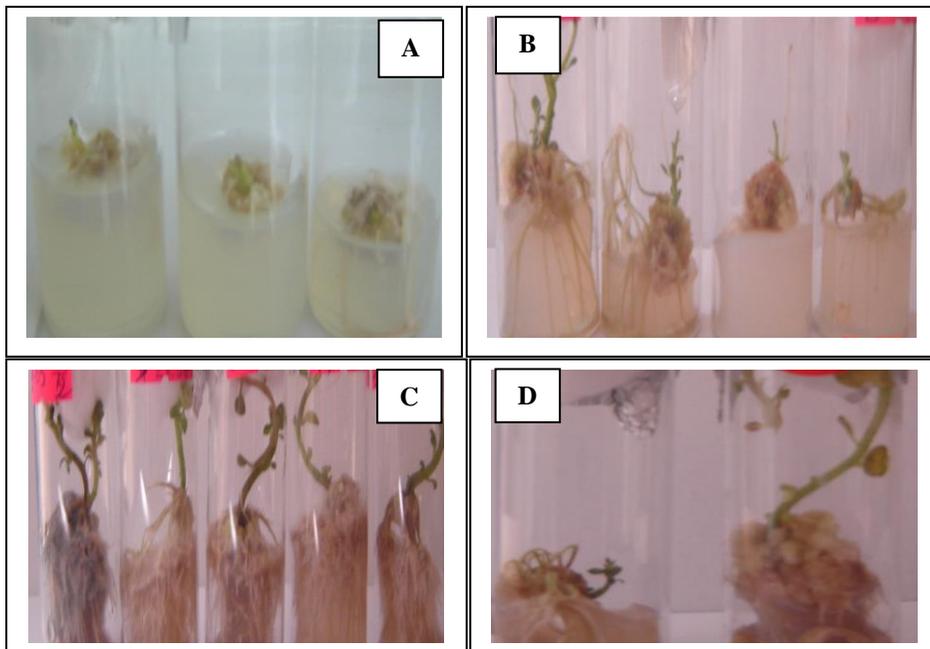
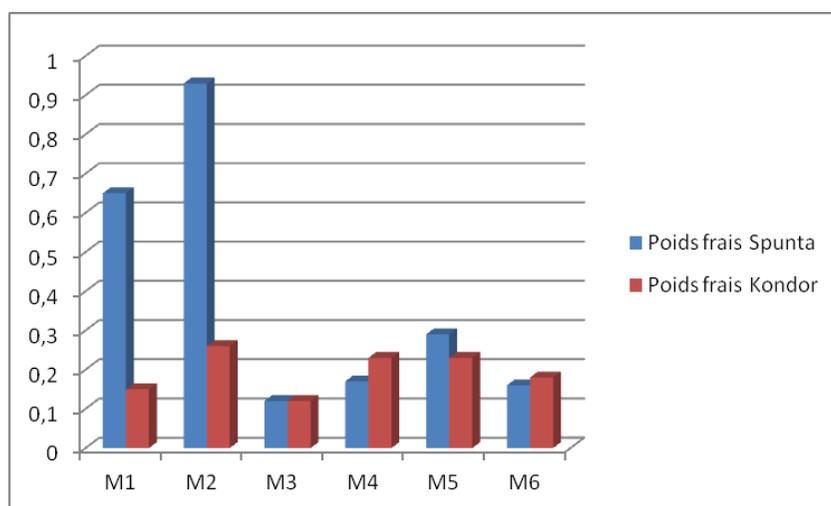


Figure 01. Callogenèse in vitro de deux variétés de pomme de terre Spunta et Kondor à l'obscurité en présence de NAA et BAP. **A** :Cals blanc après 20 jours d'incubation avec Spunta sur milieu M2 NAA+BAP (1+0.5mg/l).**B** : cals brun avec Kondor (formation de bourgeon et de racines) après 1 mois d'incubation sur milieu M5 (NAA :1mg/l).**C** et **D** :Cals bruns avec Spunta sur milieu M5 et M6 après deux mois d'incubation, avec des tiges allongées et des racines denses.

Tableau 03. Poids frais et taux de callogenèse des cals obtenu pour les germes des deux variétés après deux mois d'incubation sur les milieux (MS+NAA et NAA+BAP).

	Kondor		Spunta	
	Pois frais (g)	Taux de callogenèse	Pois frais (g)	Taux de callogenèse
M1	0.15	30	0,65	30
M2	0.26	20	0.93	30
M3	0.12	40	0.12	30
M4	0.23	40	0.17	10
M5	0.23	40	0.29	30
M6	0.18	30	0.16	20
Moyenne	0,19	0,38	33,33	25
Ecart-type	0,32	0,05	8,16	8,36
ANOVA	P=0,190		P=0,111	

**Figure 02.** Poids frais des cals obtenu pour les germes des deux variétés après deux mois d'incubation sur les milieux (MS+NAA et NAA+BAP).

Conclusion

La composition du milieu de culture et les facteurs physiques tels que la lumière, la température et l'humidité peuvent grandement affecter la voie de développement des cellules cultivées et la morphogenèse. Après une semaine d'incubation, les cals sont de couleur blanche pour (M6 et M1), Brun pour (M2, M3 et M4) de structure friable et deviennent blancs avec émission de racines à la base des explants après 15 jours. Après deux mois d'incubation, les cals prennent une structure compacte brun-blanc pour les deux variétés, le résultat de l'étude a montré que le niveau d'induction du cal et le poids du cals étaient significativement affectés par les concentrations d'auxine et,

Le taux d'induction du calus le plus élevé à partir du milieu (M3, M4 et M5), le poids de cal avec les milieux (M1 et M2) et développement des racines meilleur a été obtenu à partir du cultivar Spunta.

References:

1. Ascencio-Cabral, A; Gutierrez-Pulido, H; Rodriguez-Garay, B; Gutierrez-Mora, A (2008). Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Sci Hortic*, 118: 155-160.
2. Can E., Celiktaş N., & Hatipoğlu, R. (2008). Effect of auxin type and concentrations in different media on the callus induction and shoot formation of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn). *Biotechnol&Biotechnol. Equip.*, 22 (3), 782 – 786.
3. Chory, J., Chatferjee, M., Cook, R. K., Eligh, T., Fankhauser, C., Nagpaln, J. Li, P., Neff, M., Pepper, A., Poole, D., Reed, J., & Vitart, V. (1996). From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, pp. 12066-12071.
4. Dubois, J. (1973). Action de la lumière sur la croissance et la teneur en pigments plastidiaux des tissus isolés de carotte. *Bull. Soc. bot. F*, 120, 3-26.
5. During, H. & Harest, M. (1996). Stomatal behavior, photosynthesis and photorespiration of in vitro grown grapevines: Effect of light and CO₂. *Vitis*, 35, 163-167.
6. Elaleem, KGA., Modawi, RS., & Khalafalla, MM. (2009). Effect of plant growth regulators on callus induction in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Diamant. *Afr J Biotechnol*, 8 (11):2529-2534.
7. Elfriede, M., Linsmaier-Bednar & Thomas W. Bednar (1972). Light and hormonal control of root formation in *Zea Mays* callus cultures. *Dev Growth Differ*, 14, No.2.
8. George, EF., Hall, MA., & De Klerk, GJ. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, Vol. 1. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 501 p.
9. Jabbar Taha Alla, Dr., & Mutasher Halla, H. (2017). Increase production of some secondary products in callus of *Citrullus colocynthis* L. using chemical and physical elicitors. - *Int. J. Innov. Sci. Eng. Technol*, 4 Issue 3.
10. Jang Y., Boheum M., Taecheol S., Jungu L., Sangseok O., & Changhoo Ch. (2013). Effects of Light Quality and Intensity on the Carbon Dioxide Exchange Rate, Growth, and Morphogenesis of

- Grafted Pepper Transplants during Healing and Acclimatization. *Kor. J. Hort. Sci. Technol*, 31(1):14-23.
11. Junqian Pan & Baolin (2016). Guo .Photosynthetic Characteristics, and Flavonoid Content of *Epimedium pseudowushanense* B.L.Guo. *Molecules*, 21, 1475.
 12. Kamil Ružička, Ma'ria Šimašková, Jerome Duclercq, Jan Petrašek, Eva Zažimalová, Sibů Simonb, Jiří Frimla, Marc C. E, Van Montagua, & Eva Benková (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceeding of national academy of science of the united state of America*. 106 (11).
 13. Kowalska, L & Arseniuk, E. (2016). The effect of medium composition on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat cultivars with various resistance to *Parastagonospora nodorum*. *Indian Res. J. Genet. & Biotech*, 8(3) : 183-189.
 14. Lozzi, A., A. Abousalim., & Abdelwahd, R. (2015). Effet du 2,4-D sur l'induction de l'embryogenèse somatique à partir de cotylédons matures de caroubier (*Ceratonia siliqua* L). *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét.* 3 (3):24-29.
 15. Martin, KP (2004). Plant regeneration protocol of medicinally important *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Wallich Ex Nees Via Somatic Embryogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40:204-209.
 16. Michael, R., Bartley & Barry, Frankland (1984). Phytochrome Intermediates and Action Spectra for Light Perception by Dry Seeds'. *Plant Physiol*, 74, 601-604.
 17. Moitreyee, S., Shrivastava K & Sibgh S.S (2013). Effect of culture media and growth hormones on callus induction in *Aquilaria malaccensis* Lam. *Asian J Exp Biol Sci.*, 6(2) : 96-105.
 18. Ngoc Ai T., Htay Naing A., & Kil Kim C. (2016). Influences of different light sources and light/dark cycles on anthocyanin accumulation and plant growth in *Petunia*. *J Plant Biotechnol*, 43:119–124.
 19. OuYang, F., Mao, J.F., Wang, J., Zhang, S., & Li, Y. (2015). Transcriptome analysis reveals that red and blue light regulate growth and phytohormone metabolism in Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. *PLOS ONE*, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0127896>.
 20. Pablo Manzur J., Calvache-Asensio M I N, & Rodriguez-Burruezo Arian (2014). Growth regulators and darkness increase efficiency in *in vitro* culture of immature embryos from peppers. *Sci. Agric*, 71, n.6, p.488-493.

21. Paniagua Pardo G., Hernández Aguilar, Caudia., Martínez, F. R., Domínguez Pacheco, A., Lizbeth Martínez C., Ortiz E .M (2013). High intensity LED light in letuce seed physiology (*Lactuca sativa* L.) *Acta Agrophysica*, 20(4), 665-677.
22. Rahayu, S ., Roostikai, I., & Bermawie, N. (2016). The effect of types and concentrations of auxins on callus induction of *Centella asiatica*. *Nusantara Bioscience*, 8, No. 2, pp. 283-287.
23. Schroeter-Zakrzewska, A., & Kleiber, T. (2014). The effect of light colour and type of lamps on rooting and nutrient status in cuttings of Michaelmas daisy. *Bulg J Agric Sci*, 20 (No 6), 1426-1434.
24. Soontornchainaksaeng, P., Chaicharoens, S., Sirijuntarut, M., & Kruatrachue M. (2001). In vitro studies of the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L'Herit) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. *ScienceAsia* 27: 233–237.
25. Syahirah Azmi, Nurul., Ahmad, R., & Ibrahim, R. (2014). Effects of Red and Blue (RB) LED on the *in vitro* Growth of *Rosa Kordesii* in Multiplication Phase. 2nd Int. Conf. on Agric and Biotechnol. *IPCBE*. 79.
26. Tavakkol Afshari R. Angoshtari, R., & Kalantari, S. (2011). Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *P Orthop J*, 4(2):60-67.
27. Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Fillonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 69, no. 3, p. 233-249.
28. Weiguo Fu, Pingping Li, Yanyou Wu & Juanjuan Tang (2012). Effects of different light intensities on anti-oxidative enzyme activity, quality and biomass in lettuce. *Hort. Sci*, 39, 3: 129–134.