

Soumis le : 21 Juillet 2013
 Forme révisée acceptée le : 16 Avril 2014
 Email de l'auteur correspondant :
 benyounesaziz@yahoo.fr

Nature & Technology

Influence du génotype, du type d'explant et de la balance hormonale sur la callogenèse chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.)

Amina KADIRI, Zohra IGHILHARIZ, Louiza BOUABDALLAH, Yamina HALFAOUI

Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université ORAN 1, Ahmed Benbella

Résumé

La callogenèse chez *Cicer arietinum* étant définie de nature récalcitrante, une étude est entreprise afin de déterminer les conditions favorables à une expression optimale du pouvoir callogène. Des explants d'entrenœuds et de folioles de 4 génotypes de pois chiche, ICC 3996 C, Zouaoui, INRA 199 et Bousahla sont mis en culture sur le milieu MS (Murashige et Skoog) additionné de balances hormonales d'auxines (acide 2, 4- dichlorophenoxyacétique, acide naphtylacétique) et de cytokinine (6 benzylaminopurine). L'analyse des résultats obtenus après un mois de culture révèle l'influence des effets individuels et interactifs des trois facteurs, génotype, source de l'explant et la combinaison hormonale choisie. Le génotype Zouaoui a montré une meilleure réactivité par rapport à ICC 3996 C, INRA 199 et Bousahla. Les explants d'entrenœuds se montrent plus callogène que les folioles. Une meilleure callogenèse est obtenue avec les milieux de culture additionnés d'auxine et de cytokinine combinées (MS7, MS14) comparé à ceux contenant seulement des hormones auxiniques (MS1, MS5, MS11).

Mots clés *Cicer arietinum* L., entrenœuds ; folioles ; génotype, régulateurs de croissance.

1. Introduction

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est une importante légumineuse cultivée sur environ 10 millions d'hectares, à travers le monde, avec une production annuelle proximale de 8,28 million de tonnes [1]. C'est une source de protéines, de vitamines et de minéraux pour la consommation humaine, notamment dans les pays en voie de développement où les protéines d'origine animale sont souvent inaccessibles pour les larges couches sociales. C'est également une culture intéressante en agriculture alternative dans les pays industrialisés vu sa capacité à fixer près de 70% de l'azote atmosphérique grâce à une relation symbiotique établie avec *Rhizobium ciceri* [2].

Malheureusement, et malgré la large demande, la production de pois chiche n'a pas augmenté durant ces dernières décennies spécialement dans les pays du bassin méditerranéen [3], sous l'effet de facteurs biotiques et abiotiques. Les efforts fournis pour y remédier à travers les moyens de sélection traditionnels restent insuffisants et

doivent être assisté par les outils modernes de la biotechnologie. Les récents progrès en culture de cellules et

de tissus *in vitro* ont permis l'apparition de plantes à caractères intéressants [4]. La culture de tissus, notamment la callogenèse peut induire une variation somaclonale ou variabilité génétique, source de caractères intéressants pour l'amélioration des plantes [5]. Cette voie prometteuse nécessite cependant la mise au point d'un protocole standardisé et fiable. Chez les légumineuses tel le pois chiche, ceci reste difficile vu leur nature récalcitrante [6; 7]. De nombreux travaux traitant l'initiation de la callogenèse chez *Cicer arietinum* rapportent ce phénomène [8; 2; 9].

Ainsi, un protocole de callogenèse permettant l'application des techniques de biotechnologie dans la transformation et la sélection de plantes résistantes aux stress est nécessaire.

L'initiation de la callogenèse dépend de plusieurs facteurs comme la nature et la concentration des régulateurs de croissance ajoutés au milieu de culture, le génotype et les explants testés [10; 11]. Le but de ce travail est d'étudier l'effet de ces facteurs sur l'induction de la formation de cals pour déterminer les conditions favorables à la callogenèse chez *Cicer arietinum* L.

2. Matériel et méthodes

2.1. Le matériel végétal

Les graines de quatre génotypes de pois chiche; ICC 3996 C, Zouaoui, INRA 199 et Bousahla sont utilisées pour fournir le matériel végétal.

Elles sont mises en culture dans des pots de 12 x 12 cm, contenant un mélange de terre et de terreau (3:1, v/v), autoclavé, à raison de 3 graines par pot. La culture est menée sous serre, où les plantes sont arrosées quotidiennement.

2.2. Les milieux de culture

Nous avons utilisé le milieu Murashige et Skoog [12] (MS) de base, additionné de 5 différentes combinaisons hormonales (Tab. 1). Les différents milieux contiennent 30g/l de saccharose et sont solidifiés avec 10g/l d'agar. Le pH est ajusté à 5,8 avant autoclavage.

Tableau 1 Combinaisons hormonales ajoutées au milieu MS pour l'initiation de la callogenèse chez *Cicer arietinum*

Milieux	Hormones (mg/l)		
	2,4-D	ANA	BAP
MS1	2	-	-
MS5	-	0,5	-
MS7	0,5	-	1
MS11	2	0,5	-
MS14	-	0,5	2,25

2.3. L'induction de la callogenèse

L'initiation de la callogenèse est établie à partir d'explants foliaires d'environ 8x5 mm et d'entrenœuds de 5 mm de longueur, prélevés de plantes âgées de 03 semaines. Ils sont désinfectés par immersion dans de l'éthanol à 70° pendant 30 secondes, puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5% pendant une minute et enfin rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile.

2.4. Dispositif expérimental et conditions de culture

Les deux types d'explant des quatre génotypes testés sont répartis suivant un dispositif randomisé à raison de 10 explants par combinaison hormonale et 05 répétitions

indépendantes, soit 50 observations pour chaque traitement. L'incubation est réalisée à 25° C ± 2 sous une photopériode de 16 h lumière / 8 h obscurité.

La réponse des explants est suivie régulièrement et l'effet des différents traitements est évalué après quatre semaines. Le pourcentage est calculé sur la base du nombre de calcs formés par rapport au nombre total des explants testés.

3. Analyse statistique

Les pourcentages de calcs formés à partir des deux types d'explants des différents génotypes sont analysés grâce au logiciel Statistica version 10. Une analyse de variance est d'abord effectuée pour évaluer la significativité des effets testés, puis le coefficient de corrélation de rang de Spearman est calculé pour évaluer la relation entre les facteurs testés et la callogenèse, et son niveau de signification. Les moyennes sont comparées par le test de Tukey HSD (Honestly Significant Difference) afin de déterminer les groupes homogènes à $\alpha=0,05$.

4. Résultats

Les milieux testés avec les différentes balances hormonales ont induit la formation de calcs à partir des explants d'entrenœuds et de folioles chez les 4 génotypes de *Cicer arietinum* testés, ICC 3996 C, Zouaoui, INRA 199 et Bousahla. Dès la première semaine, les explants mis en culture montrent une réactivité aux milieux de culture. Les explants de tiges se gonflent sous l'effet de divisions cellulaires internes qui aboutit à l'apparition de petits amas de cellules ou calcs sur l'explant

Pour les folioles, cette formation peut concerner toute la surface du limbe, le long de la nervure principale ou les zones d'excision. Après quatre semaines, les calcs formés présentent des caractéristiques variables avec différentes couleurs et textures selon la combinaison hormonale ajoutée au milieu. Les calcs formés sur le milieu MS7 sont friable de couleur jaune à verte, durs vert foncé sur MS14 (Fig.1); petits hydratés, beiges sur MS1 et MS11 et petits beiges à surface dure sur le milieu MS5.

Une différence significative est observée dans la réponse à l'initiation de la callogenèse chez les entrenœuds et les folioles des 04 génotypes testés, avec un pourcentage variant entre 0 et 100%. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 2.

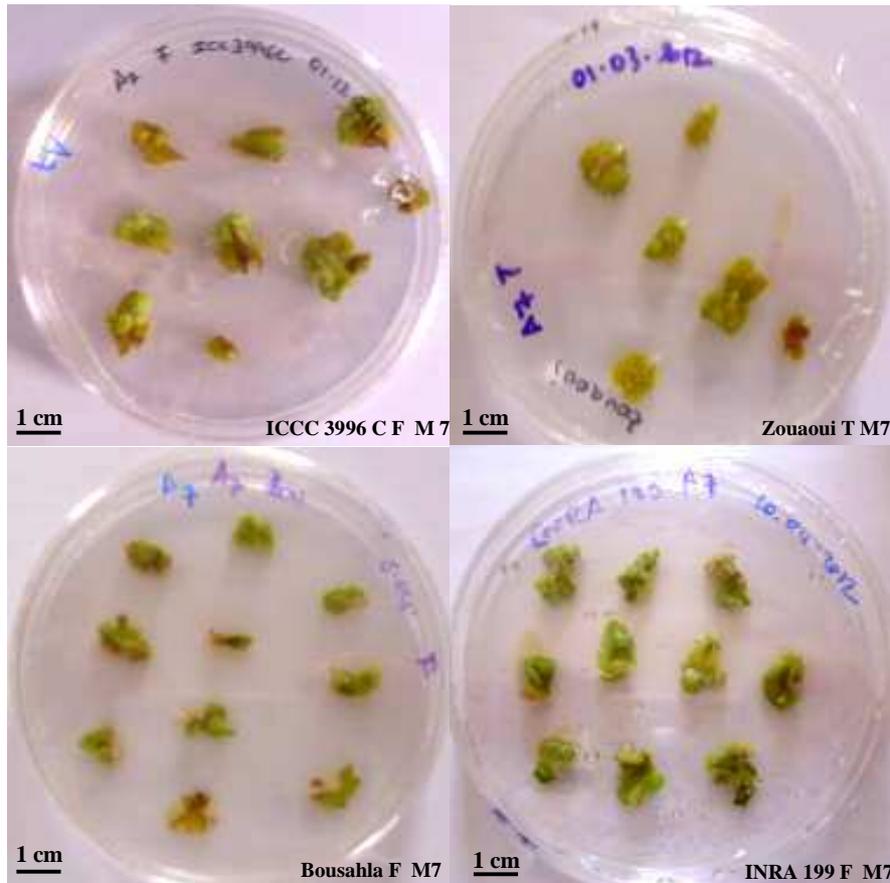


Fig. 1: Aspect des cals issus de folioles (F) et tiges (T) de *Cicer arietinum*, après un mois de culture *in vitro* sur le milieu MS additionné de différentes combinaisons hormonales sous une photopériode de 16h lumière /8h obscurité à 25°C± 2.

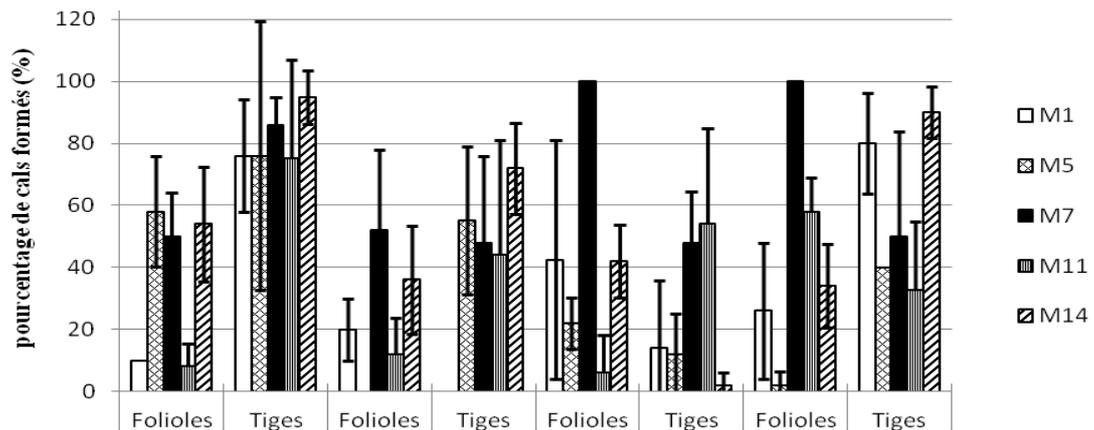


Fig. 2 : Pourcentage des cals formés chez les entrenœuds et folioles de 04 génotypes de pois chiche, mis en culture sur le milieu MS additionné de différentes balances hormonales

L'analyse de variance (Tab.2) montre que l'initiation de la callogénèse chez *Cicer arietinum* dépend du génotype utilisé, de la nature de l'explant testé, de la balance

hormonale choisie et également de l'effet interactif de ces trois facteurs réunis (Tab.2).

Tableau 2

Analyse de variance de l'effet des régulateurs de croissance sur la callogénèse chez les folioles et les entrenœuds de 04 génotypes de *Cicer arietinum* L.

Effets	Somme des carrés	ddl	Carré des moyennes	F	P
Génotype	3922,3	3	6285,23	14,22	0*
Explant	35755,6	1	24185	54,74	0*
Milieu	7656,1	4	6646,32	15,04	0*
Génotype*Explant	16122,2	3	2185,83	4,94	0,00273*
Génotype*Milieu	14277,8	12	1825,39	4,13	0,00002*
Milieu*Explant	9277,1	4	1291,37	2,92	0,02344*
Génotype*Milieu*Explant	18387,3	12	3309,24	7,49	0*

Significatif à $\alpha=5\%$.

Tableau 3

Matrice de corrélation de Spearman de la callogénèse, le génotype, explant et milieu de culture utilisés chez le pois chiche

	Génotype	Explant	Milieu	Cals
Génotype	1,000			
Explant	0	1,000		
Milieu	0	0	1,000	
Cals	-0,162*	0,227**	0,220**	1,000

** : Significatif à $p \leq 0.001$

* : Significatif à $p \leq 0.05$

Tableau 4

Pourcentages des cals obtenus chez les 04 génotypes de *Cicer arietinum* mis en culture

Genotypes	Folioles	Entrenœuds	Moyenne par génotype
ICC 3996 C	44 a b	58.5 a	51.3 a
Zouaoui	36 a	82.4 b	59.2 b
INRA 199	26a a	41.8 a c	33.9 c
Bousahla	24.a	45 c	34.9 c
Moyenne par explant	45 a	61.7 b	

Les résultats sont des moyennes de cals obtenues après 4 semaines de culture *in vitro* de folioles et de tiges de 04 génotypes de *Cicer arietinum*. Sur la même colonne, les valeurs suivies de lettres analogues ne sont pas significativement différentes, selon le test HSD de Tukey à $t P \leq 0.05$

3.1 Effet du génotype sur l'induction de la callogenèse

L'initiation de la callogenèse chez le pois chiche semble être fortement liée au génotype testé ($p < 0.05$ par ANOVA, Tab. 2). Une corrélation significative est observée entre ces deux facteurs ($r = -0.162$, $p < 0.05$ Tab. 3). La comparaison des moyennes par le test de Tukey (Tab.4) révèle que la différence entre les moyennes obtenues chez les 04 génotypes mis en culture est significative. Trois groupes homogènes peuvent être distingués. Le génotype Zouaoui montre un potentiel callogène élevé avec 59,2% de cals formés, suivi du cultivar ICC 3996 C avec 51.35%. Les cultivars INRA 199 et Bousahla se révèlent moins réactifs avec 33,9 % et 34,9% de cals produits respectivement.

3.2. Effet du type d'explant sur la callogenèse

Le choix de l'explant influence significativement l'initiation de la callogenèse chez *Cicer arietinum* L. ($p < 0.05$ par ANOVA, Tab. 2). Par ailleurs, il est observé que le coefficient de corrélation de rang de Spearman pour ces deux facteurs, est hautement significatif ($r = 0.227$, $p < 0.001$, Tab. 3). L'étude discriminative des moyennes de cals produits selon les deux types d'explants étudiés montre que l'expression du potentiel callogène est élevé chez les entrenœuds comparé aux folioles. Ainsi, 61.7% d'entrenœuds mis en culture ont formés des cals contre 45 % chez les folioles (Tab. 4).

3.3. Effet de la balance hormonale sur la callogenèse

Les régulateurs de croissance additionnés au milieu de culture ont un effet significatif sur le déclenchement du processus de formation de cals ($p < 0.05$, Tab.2). Les résultats obtenus indiquent que la corrélation entre ces deux facteurs est hautement significative ($r = 0.220$, $p < 0.001$, Tab. 3). Toutes les combinaisons hormonales testées induisent une initiation de la callogenèse, cependant, selon la moyenne des cals formés à partir des entrenœuds et folioles chez tous les génotypes confondus (Tab. 5), des différences significatives sont relevées. Les milieux regroupant une auxine (2,4-D ou ANA) et une cytokinine (BAP), permettent d'enregistrer des taux de callogenèse élevés. C'est le cas des milieux MS7 contenant 0, 5 mg/l de 2, 4-D et 1mg/l de BAP et MS14 avec 0, 5 mg/l ANA et 2,25 mg/l de BAP où le pourcentage de cals produits atteint respectivement, 68,10 % et 48,72 %. Néanmoins, les milieux incluant seulement des hormones de type auxinique tels le milieu MS1 avec 2 mg/l de 2,4-D, MS5 contenant 0, 5 mg/l d'ANA ou MS11 avec 2 mg/l de 2,4-D et 0,5 mg/l d'ANA, montrent une diminution dans les pourcentages de cals formés avec respectivement 35,93 %, 33,05 % et 39,69% (Tab. 4). Par ailleurs, les cals obtenus sur ces combinaisons hormonales présentent un brunissement.

Tableau 5

Initiation de la callogenèse à partir de folioles et entrenœuds de quatre génotypes de *Cicer arietinum* L. sur le milieu MS additionné de différentes combinaisons de régulateurs de croissance.

Milieux	Génotypes	ICC 3996 C		Zouaoui		INRA 199		Bousahla		Moyennes
		Folioles	Entrenœuds	Folioles	Entrenœuds	Folioles	Entrenœuds	Folioles	Entrenœuds	
MS1 MS 2,4-D+(2mg/l)		26±21.90	80 ±16.32	10 ± 0	80 ± 15.81	14 ± 1.9	37.5 ± 3.49	20 ± 10	0 ± 0	35,93 a
MS5 MS ANA 0,5mg/l		2 ± 4.47	40 ± 0	58±17.88	76 ± 43.35	12 ± 3.03	22 ± 8.36	0 ± 0	55± 23.8	33,05 a
MS7 MS+0.5 mg/l 2,4-D 1 mg/l BAP		100 ± 0	50 ± 33.91	50 ± 4.14	86 ± 8.94	48±16.4	100 ± 0	52 ±25.9	48 ± 27.7	68,10 b
MS11 MS+ 2 mg/l 2,4-D-0.5 mg/l ANA		5 ± 16.43	32.5± 22.17	8 ± 8.36	75 ± 36.96	54±34.35	7.5 ± 15	20 ± 10	73.3 ±15.3	39,69a
MS14 MS+0.5 mg/l ANA 2.25 mg/l BAP		40 ± 2.24	90 ± 8.16	54 ± 0.73	95 ± 10	2 ± 4.47	42 ± 13	32.5±20,61	48 .6 ± 41.2	48,72 c

Les résultats sont des moyennes ± écarts types après 4 semaines de culture. Les valeurs dans une même colonne suivies de lettres analogues ne sont pas significativement différentes selon le test de HSD Tukey à $P \leq 0.05$.

4. Discussion

L'établissement d'un protocole de callogenèse qui permet de contourner la nature récalcitrante du pois chiche à la culture de tissus et d'obtenir un taux élevé de cals, serait une importante étape pour toute transformation chez cette plante. Dans cette perspective, l'étude de l'effet de quelques facteurs régissant la callogenèse est entreprise. Les explants de folioles et d'entrenœuds de trois génotypes de *Cicer arietinum* L. sont mis en culture sur le milieu MS additionné de différentes combinaisons d'auxines (2,4-D, ANA) et de cytokinines (BAP). Après 1 mois de culture *in vitro*, un taux variable de callogenèse est obtenu. Cette différence est sous l'influence des effets individuels et interactifs de trois facteurs à savoir le génotype, la source d'explant mis en culture et la balance hormonale ajoutée au milieu. Ces trois éléments réunis, sont décisifs pour l'expression du potentiel callogène chez *Cicer arietinum* L. [13]; [14].

Les résultats montrent que le taux de callogenèse diffère significativement selon le génotype utilisé. La variété Zouaoui présente une réactivité plus élevée avec 59, 2% de cals obtenus par rapport aux génotypes ICC 3996 C (51.3%), Bousahla (34.9%) et INRA 199 (33.9%). [14] rapportent que la réponse de deux génotypes indigènes de pois chiche, KK1 et Hassan-2 K soumis à des conditions identiques de culture *in vitro*, expriment des aptitudes différentes à la callogenèse. L'effet récalcitrant observé chez certains génotypes peut être attribuée à leurs caractéristiques physiologiques [15]

notamment aux taux d'hormones endogènes ou à une inhabilité génétique [16]. Cette relation cause à effet entre le génotype et la callogenèse est souvent rapportée chez le pois chiche [17]; [18]; [9]; [14] et d'autres espèces comme le tabac [19] et le palmier dattier [16].

Par ailleurs, les deux explants mis en culture montrent une aptitude à la callogenèse différente. Ainsi, 61.7% des entrenœuds mis en culture produisent des cals et seulement 45% dans le cas des folioles. [17], [20], [10] et [13] indiquent que la source d'explant influe sur la réponse de la callogenèse, le type d'explant et éventuellement sa structure anatomique qui jouerait un rôle significatif dans l'initiation de la callogenèse. La spécificité de la réponse chez les différents organes ou tissus dépend de leur réactivité aux composants du milieu de culture [21].

La réponse *in vitro* des explants de pois chiche est fortement liée aux régulateurs de croissance utilisés et à leur concentration dans le milieu. Le type d'hormones utilisées pour les différentes réponses morphogénétiques ciblées, diffèrent d'un tissu à l'autre selon leur statut métabolique [22]. Selon [23], le choix des hormones est plus déterminant pour l'induction de la callogenèse que leur concentration. Ces deux hormones (auxines et cytokinines) sont connues pour leur effet direct et/ou indirect sur l'induction de la prolifération cellulaire et /ou leur orientation vers une organisation spécifique [24]. Elles peuvent agir en synergie

ou antagonisme [25]. Les auxines favorisent l'induction et le maintien de la prolifération cellulaire [26], sont indispensables à la synthèse de l'ADN et jouent un rôle décisif dans la culture de tissu vu leur pouvoir stimulant pour la prolifération cellulaire [27]; [28]. Les cytokinines permettent la division des cellules proprement dite et agissent avec les auxines pour stimuler leur multiplication [27].

Chez le pois chiche, une initiation importante de la callogenèse est obtenue sur le milieu MS additionné de BAP/2,4-D, BAP/ANA. Ceci suggère que la combinaison d'une auxine et d'une cytokinine est favorable à l'induction de la callogenèse chez cette espèce. Un résultat similaire est rapporté par [29], [30], [9], [31] et [15] qui indiquent que la combinaison entre ces deux hormones est favorable pour induire la dédifférenciation puis la prolifération des cellules chez le pois chiche.

L'ajout d'auxines (2,4-D ou NAA) aussi bien seules que combinées semble produire un taux de cals relativement faible pour tous les génotypes testés. Ceci vient à l'encontre des résultats rapportés par [32], [33] et [6] où l'emploi du 2,4-D seul favorise une bonne callogenèse chez le pois chiche. Cette hormone peut induire, chez le pois chiche, la formation de cals et sa combinaison avec une cytokinine tel le BAP permet, selon [14], leur prolifération. Ces différents

résultats démontrent la nécessité d'établir un protocole de callogenèse pour chaque génotype [20] ; [22].

Le brunissement des cals observé sur quelques milieux de culture est souvent remarqué lors de la culture de tissus *in vitro* chez le pois chiche [6 ; 9 ; 23 ; 31] et serait probablement dû à l'accumulation de polyphénols [24].

Les résultats obtenus concluent que la callogenèse chez *Cicer arietinum* L. dépend de l'interaction de plusieurs facteurs, à savoir le choix du génotype, la source de l'explant et la combinaison hormonale ajoutée au milieu de culture.

Le taux des cals obtenus chez le génotype Zouaoui est plus élevé par rapport aux variétés ICC 3996 C, INRA 199 et Bousahla. La réponse des explants varie en fonction de la composition du milieu en régulateurs de croissance. Cette prolifération cellulaire importante se manifeste en présence du 2,4-D et BAP ou 2,4-D et ANA pour les explants de tiges et de feuilles. Toutefois, les tiges sont plus réactives que les feuilles.

Remerciements : Les auteurs remercient Dr. Labdi M. de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Sidi-Bel-Abbès pour l'approvisionnement en graines.

Références

- [1] Akidobe S, Maredia M (2011) Global and Regional Trends in Production, Trade and Consumption of Food Legume Crops, SPIA reports Department of Agricultural, Food and Resource Economics Michigan State University 83 p.
- [2] Zaman M A., Manjur A B M K, Ahmed M, Islam M M (2010). Effect of 2, 4 - D on Callus Induction and Subsequent Morphogenesis in Mature Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Embryo Culture, Proc. Sixth Intl. Plant Tissue Cult. & Biotech. Conf., Bangladesh Assoc. Plant Tissue Culture and Biotechnology 53 - 58.
- [3] Benzohra I E, Bendahmane B S, Mahiout D, Youcef Benkada M, Labdi M (2010). Pathogenic Variability of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) in the Western North of Algeria. World Journal of Agricultural Sciences 6(5): 630-634.
- [4] Sutan A N, Popescu A, Isac V (2010). *In vitro* culture medium and explant type effect on callogenesis and shoot regeneration in two genotypes of ornamental strawberry, Romanian Biotechnological Letters 15(2):12-18.
- [5] Shahab-ud-din, Sultan I N, Kakar, M A, Yousafzai A, Sattar F A, Ahmmad F, Ibrahim S M, Hassanullah M, Arif B (2011). The effects of different concentrations and combinations of growth regulators on the callus formation of potato (*Solanum tuberosum*) explants. Current Research Journal of Biological Sciences 3(5): 499-503.
- [6] Naz S, Ali A, Ahmed Siddique F, Iqbal J (2008). Somatic embryogenesis from immature cotyledons and leaf calli of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pakistan Journal of Botany 48(2); 523-531.
- [7] Ochatt S J, Atif R, M, Patat- Ochatt E, Jacas M, Conreux C (2010). Competence versus Recalcitrance for *in vitro* Regeneration. World Journal of Agricultural Sciences 6 (5): 630-634.
- [8] Anwar F, Sharmila P, Pardha Saradhi P (2010). No more recalcitrant: Chickpea regeneration and genetic transformation. African Journal of Biotechnology 9(6): 782-797.
- [9] Zare Mirakabad, Bagheri A R, Zare Mehrjerdi M (2011). Efficient protocol for break impasses of regeneration via callus for 20 genotypes of Chickpea. International Journal of Plant Production 4 (2):115-128.
- [10] Barna K S, Wakhulu A K (1993). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from callus culture of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Report 12: 521-524.
- [11] Savita Vijay, Virk G S., Nagpal A (2010). Effect of explant type and different plant regulators on callus induction and plantlet regeneration *Citrus jambhiri* Lush. Environment and we An International Journal of Science & Technology 5: 97-106.
- [12] Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 443-497.
- [13] Arora A, Chawla S H (2005). Organogenic plant regeneration via callus induction on chickpea (*Cicer arietinum*) role of genotypes, growth regulators and explants. Indian Journal of Biotechnology 4: 251-256
- [14] Khan S, Ahmad F, Ali F, Khan H, Khan A., Swati Z A (2011). Callus induction via different growth regulators from cotyledon explants of indigenous chick pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars KK-1 and Hassan-2K. African Journal of Biotechnology 10(40): 7825-7830.
- [15] Sani L, Mustapha Y (2010). Effect of genotype and 2, 4- d concentration on callogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). Bayero Journal of Pure and Applied Sciences 3(1): 238 – 240

- [16] Sané D, Aberlanc- Bertossi F, Diatta L I D, Guèye B, Daher A, Sagna M, Bogel A (2012). Influence of growth regulators on callogenesis and somatic embryo development in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) sahalian cultivars. The Scientific World Journal, Article ID 837395: 1-8.
- [17] Rao B G, Chopra V L (1987). Genotypic and explants differences in callus initiation and maintenance in chickpea. International Chickpea Newsletter 17:10-12.
- [18] Islam R, Farooqui H and Raizuddin S (1998). *In vitro* genotype phytohormone interaction in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Tissue Culture 8(1): 173-175.
- [19] Ali G, Hadi F, Tariq M, Ali Khan (2007). Callus induction and *in vitro* complete plant regeneration of different cultivars of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) on media of different hormonal concentrations. Biotechnology 6(4): 561-566.
- [20] Riazuddin S, Hussain T, Malik, T, Farooqi H, Abbas T (1988). Establishment of callus–tissue culture and the induction of organogenesis in chickpea. Pakistan J. Agric. Rev. 9(3): 339-345.
- [21] Zouzou M ,Kouakou T H, Koné, M, Amani N G., Kouadio Y J (2008). Effect of genotype, explants growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Australian Journal of Crop Science 2(1):1-9.
- (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Reports 12:652-655.
- [30] Huda S, Siddique N A, Khatun N, Rahman M H, Morshed M (2003). Regeneration of shoot from cotyledon derived callus of chickpea
- [31] Aasim M, Day S, Rezaei F, Hajizadeh M, Mahmud, S T, Ozcan S(2011).*In vitro* shoot regeneration from preconditioned explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cv. Gokce. African Journal of Biotechnology 10(11):2020–2023.
- [32] Poorni K E, Manikandan A, Geethanjali S (2011). *In vitro* callus induction and detection of molecular variation (RAPD analysis) in *Cicer arietinum* L. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 7(1) 79-82.
- [33] Kumar P, Sangwan M S, Mehta N (2011). Callogenic response of calli from chickpea genotypes on exposure to culture filtrate of *Ascochyta rabiei*, J. Mycol. Pl. Pathol. 40(9):22-26.
- [22] Altaf N, Iqbal J, Salih Ahmed M. (1999). Tissue culture of microsperma lentis (*Lens culinaris* mediki) cv.massoor-85. Pak. J. Bot. 31(2):283-292.
- [23] Bharathi P., Elavarasi N (2012). Preliminary studies of reactor system designed for cell suspension culture of chickpea (*Cicer aritenum*). International Journal of Chemical Sciences and Applications 3(1):223-231.
- [24] Zrýd J P (1988).Cultures de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Presses polytechniques romandes (Eds.) 308pp.
- [25] Jones Band Ljiung K (2011). Auxin and cytokinin regulate each other's levels via metabolic feedback loop. Plant Signaling & Behavior 6(6):901-904
- [26] Boxus P, Bercetche J, Bollon, Ducas J P, Jemmali A, Pâque M, Petlard V, Pieron S (1995). Multiplication végétale, micropropagation, embryogenèses somatiques. Centre National d'Enseignement à distance (Eds.) 37-44.
- [27] Gautheret R J (1959). La culture des tissus végétaux: techniques et réalisations. Masson (Eds.) 863p.
- [28] Neumann, K.H., Kumar, A., Imani, J., 2009. Plant cell and tissue culture- A tool in Biotechnology. Basis and application, principles and practice Springer- Verlag, 333p.
- [29] Sagare A P, Suhasini K and Krishnamurthy KV, (1993). Plant regeneration via somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pakistan Journal of Biological Sciences 6(15):1310-1313.