

Microbouturage in vitro et greffage in vivo de vitroplants d'hybrides triploïdes de mandariniers

Hmouni D.^{1,2}, Handaji N.¹, Arsalane N.¹, Masoui, M.², et Rachidai A.²

¹ Institut National de la Recherche Agronomique. Laboratoire d'amélioration génétique et de culture in vitro. Centre Régional du Gharb B.P. 293. Kénitra. Maroc

² Laboratoire d'agrophysiologie. Département de Biologie, Faculté des sciences. Université Ibn Tofail, B.P. 133, Kénitra. Maroc

Résumé

La multiplication clonale in vitro d'hybrides triploïdes de citrus a été essayée dans le but de produire d'une part des plantes homogènes et saines, et d'autre part de remédier à la stérilité gamétique des génotypes triploïdes. Dans cette étude, nous avons pris comme explants des microboutures prélevées sur des plantules âgées de 18 mois et élevées en serre. Deux types d'explants sont utilisés : boutures ligneuses et boutures herbacées. Après désinfection, les microboutures sont ensemencées dans différents milieux de culture. Les résultats obtenus montrent que les microboutures herbacées sont plus réactives que les microboutures ligneuses. D'autre part, le milieu de base contenant la cytokinine BAP à 1mg l⁻¹ et pas d'auxine s'est avéré favorable à la caulogénèse. Pour la rhizogénèse, le milieu de base contenant du charbon actif à 4g l⁻¹ et de l'ANA à 1mg l⁻¹ a donné des bonnes performances (83 % d'enracinement). Pour l'étape de l'acclimatation, le taux de reprise a été de 80 %. Les vitroplants non enracinés ont été greffés en fente sur des porte-greffes de Citrange troyer. Le taux de réussite a été de 75 %.

Mots clés : Citrus, hybride triploïde, microbouturage, greffage de vitroplants

Abstract : In vitro micropropagation and in vivo vitroplant grafting of triploids Citrus hybrids

In vitro clonal propagation of hybrid triploids of Citrus was tried in order to produce on the one hand the homogeneous and whole plants, and on the other hand to remedying the sterility of triploid genotypes.

Two kinds of explants are used: woody tips and herbaceous tips. After disinfection, microcuttings were sown vertically in tubes containing 20 ml of culture medium. Results showed that herbaceous microcuttings response is better than for woody microcuttings. In addition, M1

(BAP 1mg l⁻¹) medium is shown to be favorable to caulogenesis and MCR2 medium (activated charcoal 4g l⁻¹, ANA 1mg l⁻¹) induce 84 % of rooting. Acclimatization phase, rate of recovery attained 80 %. The failure of rooting for some in vitro regenerated plants is resolved by grafting them on Troyer Citrange cultivars, in glasshouse. Percentage of success was equal to 75 %.

Key words : Citrus, triploids hybrids, micropropagation, grafting vitroplant

ملخص : التكاثر النبوتي في بيئة مصطنعة و تطعيم الشتلات الأنثوية بالمصرى لهجانن ثلاثية الصبغيات عند الحوامض

حموني إ. 2، 1، هنداجي ن. 1، أرسلان ن. 1، مسوي م. 2 و الراشدي ع. 2

1 المركز الجهوي للبحث الزراعي، المنزه، القنيطرة، المغرب

2 مختبر دراسة و وقاية النباتات، كلية العلوم، جامعة ابن طفيل، القنيطرة، المغرب

يتلخص هذا البحث في وضع طرق لتكاثر هجانن ثلاثية الصبغيات في بيئة مصطنعة. حصلنا عليها بواسطة التهجين بين فصائل من (*Citrus reticulata*) و كليمنتين سيدي عيسى (*Citrus clemantina*) و ذلك باستعمال فسيولات بعقدة أو عقدتين.

لقد تم الحصول على الفسيولات من نباتات (عمرها 18 شهرا و نشأت بالمصرى) ناتجة عن زرع أجنة هجينة غير ناضجة في بيئة مصطنعة. لقد استعملنا نوعين من الشتلات : فسل ليفي و فسل عشبي. بعد التطهير، قمنا بزرع عمودي للفسيولات في أنابيب تحتوي على 20 ملم من الوسط الزراعي مع احترام القطبية.

إن النتائج المحصل عليها تبرز أن الفسيولات العشبية أكثر تفاعلية مع الفسيولات الليفية. بالإضافة إلى أن الوسط M11 (ب 1 مغ/ل) بدأ أكثر ملاءمة لتكوين الساق كما أن الوسط MCR1 المحتوي على الفحم النشط 4 غ/ل و أن 1 مغ/ل أتاح تجديرا بنسبة 75 %. و بخصوص مرحلة التوطن لاحظنا أن قيمة الإسترجاع بلغت 80 %.

كما لوحظ فشل عملية التحذير بالنسبة لبعض الشتلات الأنثوية و هو ما تمت معالجته بواسطة تطعيمها بأصول تطعيم *Citrus Troyer* ناشئة بمصرى زجاجي. وقد نجح التطعيم بنسبة 75 %.

الكلمات المفتاحية : الحوامض، ثلاثية الصبغيات، الإكثار، التطعيم، كليمنتين سيدي عيسى

Introduction

Au Maroc, couvrant une superficie plantée globale d'environ 75000 hectares (1 % de la surface agricole utile du pays et 10 % de la superficie arboricole nationale), le secteur agrumicole offre une production annuelle oscillant entre 1 et 1,4 million de tonnes par an dont environ 50 % sont exportées et le reste est destiné au marché intérieur de fruits frais et à l'industrie de transformation. Actuellement, le secteur agrumicole connaît certains problèmes notamment le vieillissement des vergers, l'extension des maladies de dégénérescences (ma-

ladies virales) et l'ancienneté du profil variétal. Cet état de fait suscite à songer à la rénovation (création de nouvelles variétés) et à la reconstitution des vergers agrumicoles en vue d'améliorer la production et de pallier aux contraintes de la concurrence.

Dans ce cadre, l'INRA (Centre El Menzeh, Kénitra), et par des hybridations entre mandarinier (*Citrus reticulata*) et Clémentine Sidi Aissa (*Citrus clementina* Blonco), a obtenu un certain nombre d'hybrides triploïdes (Handaji et Hmouni., résultats soumis à Al Awamia). Les Citrus triploïdes sont caractérisés par une aspermie totale et par d'autres qualités pomologiques et organoleptiques dépendantes de la réussite de l'hybridation. Pour procéder à l'évaluation pomologique et l'étude du comportement de ces obtentions dans différentes régions agrumicoles, nous avons eu recours à la multiplication végétative in vitro de ces hybrides afin de pallier, d'une part à la stérilité génétique des triploïdes et d'autre part au faible taux de multiplication par greffage classique.

L'objectif de notre étude est la mise au point d'une technique de multiplication conforme permettant une production de plants par l'utilisation de matériel végétal organisé génétiquement (microbouture) profitant ainsi de l'absence de toute altération génétique (Tanaka et Ikeda, 1983). En effet, les biotechnologies végétales ont permis de grandes possibilités pour l'amélioration des Citrus (Nito et al., 1996 ; Starrantino, 1997). Pratiquement les agrumes ont fait l'objet de plusieurs travaux basés sur l'utilisation des techniques de culture in vitro : Sauvetage d'embryons (Juarez, et al., 1985, 1995 ; Ollitrault et al., 1995 ; Ramos et al., 1995a et 1995b) et micropropagation en vue d'une multiplication végétative de certains génotypes d'agrumes par microbouturage (Barlass et Skene, 1982 ; Aaouine et al., 1990 ; Pasqual et al., 1995 ; Khe-lifi Slaoui et al., 1996 ; Harda et Murai, 1996 ; Normah et al., 1997).

Matériel et méthodes

Des plantules hybrides (*Citrus clementina* Blonco x *citrus reticulata*), sont obtenues après sauvetage d'embryons immatures par culture in vitro. La triploïdie de ces hybrides a été évaluée par l'application de la technique de cytométrie en flux. A partir de ces plantules (élevées en serre et âgées de 18 mois), des baguettes de 15 cm de long ont été prélevées et découpées en sections nodales de 2 cm de long. Deux types d'explants sont utilisés : des tiges principales lignifiées (partie basale de la plante) et des rameaux herbacés portant au moins un bourgeon axillaire (partie apicale de la plante).

Protocoles de désinfection

Après lavage à l'eau courante, les microboutures ont été mises dans du mercryl laurylé pendant 10 minutes. Ensuite, le matériel végétal lignifié a été trempé dans une solution d'hypochlorite de calcium à 9 % additionnée de quelques gouttes de mouillant Tween 20 pendant 20 minutes. Pour le matériel herbacé, il a été trempé dans une solution d'hypochlorite de sodium à 4° additionnée de quelques gouttes de mouillant Tween 20 pendant 15 minutes. Enfin, les microboutures ont été rincées trois fois à l'eau distillée stérile sous hotte.

Avec ces désinfections (les contaminations, essentiellement bactériennes) n'ont pas dépassé 4 à 8 %.

Mise en culture initiale des boutures

Les milieux de culture sont préparés dans les conditions ambiantes et l'étalonnage du pH (5.8) est effectué avant l'autoclavage (24 minutes à 116 °C). La chambre de culture est réglée a une intensité lumineuse de 2000 Lux assurée par des tubes Néon, une photopériode de 16 heures et une température de 25 °C le jour et 19 °C la nuit.

Sous une hotte à flux laminaire, après élimination des extrémités nécrosées suite à la désinfection, on procède à l'ensemencement des explants, en respectant la polarité, dans des tubes à essais (dimension : 150 x 25) avec deux milieux d'initiation (24 explants par milieu de culture) contenant une formulation de base (M0) composée des sels minéraux et des vitamines de Murashige et Skoog (1962), du myo-inositol par myo-inositol à 100 mg l⁻¹, de l'agar à 8 g l⁻¹ et du saccharose à 30 g l⁻¹ mais différant comme suit :

	BAP mg l ⁻¹	ANA mg l ⁻¹
MI 1	1	0
MI 2	1	0.5

Milieux d'enracinement

Après un séjour de 3 semaines dans le milieu de culture d'initiation, les vitroplants qui ont débourré dans chaque milieu, sont transférés dans des milieux d'enracinement contenant tous la formulation M0 mais différant par leur composition en ANA et en charbon actif comme suit :

MCR1 : 1 mg l⁻¹ d'ANA, 4 g l⁻¹ de charbon actif.

MCR2 : 4 g l⁻¹ de charbon actif.

Conditions d'acclimatation et de greffage des vitroplants

Les vitroplants ayant de bonnes racines (après 4 semaines en milieu de culture) ont été acclimatés dans une serre vitrée. Une combinaison de substrats a été testée : tourbe, sable stérile et un mélange tourbe et sable (1/1). Les repiquages étaient réalisés dans des pots en plastique (7.5 cm x 9 cm) qui, pour le maintien d'une humidité maximale, ont été ensachés par du plastique transparent. Une période de 20 à 30 jours a été nécessaire pour le débourrement de vitroplants (apparition de la première feuille).

Pour les vitroplants non enracinés (40 vitroplants), nous avons appliqué une méthode de greffage in vivo. Des plantules de *citrange Troyer* élevées en serre sont décapitées, puis par l'application d'une fente, on greffe le vitroplant après l'avoir taillé en biseau par lame stérile. L'ensemble porte-greffe et greffon est ensaché par du plastique transparent afin de garder une

humidité maximale. Des arrosages à l'eau, par nébulisation manuelle, sont effectués selon les besoins.

Analyse statistique : les résultats sont analysés par le test de Newman et Keuls au seuil de 5 %.

Résultats

Etape d'initiation

Matériel végétal lignifié

Les résultats (tableau 1) montrent que le pourcentage de reprise est sensiblement faible pour les microboutures lignifiées. Ceci peut être attribué aux facteurs suivants :

- la désinfection du matériel lignifié nécessitant très souvent un protocole assez fort, ce qui peut entraîner la nécrose des cellules, d'où une faible réactivité au milieu de culture,
- l'âge des cellules du tissu des microboutures lignifiées pourrait être la cause du brunissement, ce qui a affecté le taux de reprise.
- dans le milieu MI2, la présence de la combinaison hormonale cytokinine et auxine, même en faible concentration, a entraîné une augmentation du taux de callogénèse.

Il s'est avéré que les explants lignifiés sont moins réactifs car ils manifestent une réaction de brunissement due à la libération de polyphénols dans le milieu. Ces derniers sont considérés comme antagonistes aux substances de croissance et inhibiteurs des réactions métaboliques (Angé et al., 1984).

Tableau 1. Pourcentage de reprise des explants in vitro à partir de matériel végétal lignifié

milieux d'initiation	% d'explants formant un cal	% d'explants nécrosés ou bloqués	(%) de reprise
MI1	8 a	50 a	33 a
MI2	33 b	46 a	16 a

Deux valeurs de la même colonne, ayant la même lettre, ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 % (test de Newman et Keuls).

Matériel végétal herbacé

Quand le matériel végétal est herbacé, les résultats (tableau 2) montrent que le taux de reprise est très satisfaisant par rapport à celui obtenu avec le matériel lignifié (respectivement 79 % et 33 %) et dépend étroitement de la composition des deux milieux de culture testés.

Tableau 2 : Pourcentages de reprise des explants *in vitro* à partir de matériel végétal herbacé

milieux de culture	(%) d'explants formant un cal ou restant dormant	(%) de reprise
MI1	16 b	79 a
MI2	62 a	37 b

- le milieu MI2 caractérisé par la présence d'une concentration en BAP (1 mg.l⁻¹) et en ANA (0.5 mg.l⁻¹) a favorisé d'une façon assez prononcée un phénomène de callogénèse. Ceci est lié essentiellement à un déséquilibre fonctionnel (ce qui a orienté l'organogénèse vers une callogénèse).

Le milieu MI1, (caractérisé par une composition hormonale en BAP de 1 mg.l⁻¹), le pourcentage de reprise des explants est important (79 %) il a été constaté que ce milieu de culture a permis, quel que soit l'hybride non utile, une initiation assez accélérée des bourgeons des microboutures. Ceci est due probablement à un équilibre hormonal entre les cytokinines apportés au milieu et les auxines endogènes propres aux explants. En effet, dans nos conditions, l'addition de la BAP (1 mg.l⁻¹) et de l'ANA (0.5 mg.l⁻¹) au milieu MI2 a entraîné une orientation vers une callogénèse à la base des explants s'étendant parfois à l'ensemble de l'explant (l'extrémité supérieure des microboutures). Les cals obtenus sont compacts et de couleur verdâtre à blanchâtre. La prolifération cellulaire intense à la base des explants pourrait se différencier en un nombre élevé de bourgeons végétatifs qui peuvent évoluer en pousses feuillées. Pour éviter toute perte de conformité, les plantules régénérées à partir de cal ont été éliminées.

Au terme de cette partie, l'examen des résultats permet de constater que les microboutures herbacées donnent un pourcentage élevé de démarrage de bourgeons axillaires par rapport aux microboutures ligneuses de la partie basale. Il serait donc préférable pour les agrumes d'éviter toute régénération à partir de microboutures lignifiées.

Etape d'enracinement des explants

Après un séjour de trois semaines dans le milieu d'initiation, les vitroplants obtenus après la phase de multiplication ont été repiqués sur les milieux d'enracinement MCR1 et MCR2. Les résultats (Tableau 3) montrent un effet significatif de la composition de milieu.

Tableau 3. Pourcentages d'enracinement des vitroplants

milieux de culture	nombre d'explants mis en culture	Nombre d'explants enracinés	% d'enracinement
MCR1	48	40	83 a
MCR2	48	14	30 b

Sur le milieu MCR2 (absence d'ANA), 30 % des vitroplants ont développé des racines. Ces racines sont peu développées en profondeur. Par contre, avec le milieu MCR1 (ANA : 1 mg.l⁻¹), les vitroplants ont présenté un taux d'enracinement de 83 %. Les racines formées sont épaisses, blanchâtres, pouvant atteindre jusqu'à 1,5 centimètres de longueur. Des racines

secondaires, de longueurs inégales, sont aussi obtenues. La présence du charbon actif dans le milieu MCR1, en combinaison avec l'ANA, pourrait être la cause de l'amélioration du taux d'enracinement dans le milieu MCR2.

Pour le comportement des hybrides triploïdes au sein des milieux d'enracinement, nous avons remarqué une différence de réactivité des explants au niveau du temps nécessaire pour l'enracinement et pour le démarrage des bourgeons.

Acclimatation et application de la technique de greffage des vitroplants in vivo

L'acclimatation constitue une étape très importante dans le processus de régénération par culture in vitro. En effet, lors du transfert sur le substrat inerte, les vitroplants peuvent dépérir pour diverses raisons : contamination, faible humidité, déshydratation, etc.....

Pour les trois types de substrats testés, nous avons obtenu le meilleur taux de reprise des vitroplants (80 %) dans le mélange tourbe et sable. Une différence a été notée au niveau du temps de la reprise (20 à 30 jours) ainsi que dans la morphologie des vitroplants. Dans le substrat sableux, les vitroplants ont nécessité un temps plus long pour l'émission de la première feuille avec présentation d'un aspect effilé du tronc. Dans la tourbe, une grande humidité pourrait entraîner des infections par champignons ou par pucerons.

Pour les vitroplants qui n'ont pas développé le système racinaire, nous avons appliqué la technique de greffage en fente, sur des plantules de *Citrangle Troyer* élevées en serre vitrée. Cette technique nous a permis d'obtenir un taux de débourrement de 75 % permettant ainsi un gain en temps de plants greffés, indépendamment des conditions climatiques et physiologiques qui limitent le taux de réussite du greffage in vivo des Citrus au niveau des serres.

Discussion

Pour la sensibilité des agrumes aux hormones, elle a été rapportée par Harda et Murai, (1996) et Eugenio et Neftali, (1997), ce qui pourrait expliquer l'obtention du phénomène de callogénèse pour le milieu MI2. Sim et al., (1989) avec une concentration de 0.5 mg.l⁻¹ de BAP additionné au milieu MS ont obtenu 2,3 bourgeons en moyenne après six semaines de culture pour des microboutures de *Citrus mitis*. Maiza en (1980), a remarqué, sur un milieu contenant 1 mg.l⁻¹ BAP et 0.1 mg.l⁻¹ d'ANA, une très faible callogénèse. Aussi, ce même auteur, en utilisant des microboutures de quelques variétés de Citrus a pu produire 3 à 4 bourgeons en moyenne pour le *Citrus sinensis*, " var. Hamlin ", 5 bourgeons en moyenne pour " var. Vinous", et 3 bourgeons en moyenne pour le *Citrus limon* " var. Eureka ", avec le milieu MS additionné de 1 mg.l⁻¹ de BAP. Les mêmes résultats ont été obtenus par Khelifi-Slaoui et al., (1996) pour le *Citrangle troyer*.

Concernant l'effet de l'âge de l'explant, Khelifi-Slaoui et al., (1996), ont montré que dans le cas du *Citrangle troyer*, les explants herbacés étaient plus réactifs et n'ont pas manifesté de brunissement. Thomas et Ravindra, (1997) ont rapporté que le problème de l'exsudation des pro-

duits phénoliques est lié au milieu de culture, au génotype, à l'explant et à la saison du prélèvement des explants.

Pour l'étape d'enracinement, nous avons obtenu un taux faible par rapport aux résultats de Starantino et Caruso (1987) qui, avec une concentration d'ANA (1mg.l^{-1}) ont obtenu 95 % d'enracinement après 15 jours d'induction. Aaouine et al., (1990) ont obtenu un taux d'enracinement variant, selon la concentration de l'ANA, de 20 à 95 %, la concentration de 1mg.l^{-1} a été l'optimum. Khelifi-Slaoui et al., (1996) ont obtenu un taux d'enracinement de 40% pour une concentration en ANA (1mg.l^{-1}), cette différence pourrait être due à l'effet génotype de l'explant (effet variétal). Harada et Murai, (1996) ont utilisé l'AIB comme auxine et ils ont obtenu un taux d'enracinement variant de 90 % à 100%.

Conclusion

L'utilisation des techniques classiques pour la multiplication des agrumes souffre de plusieurs limitations telles que l'hétérogénéité, l'insuffisance ou l'absence de graines (génotypes triploïdes) ainsi que le faible taux de réussite du greffage classique. La culture *in vitro* a été utilisée dans le but d'augmenter le taux de multiplication d'hybrides triploïdes. A la lumière des résultats des expérimentations réalisées seules les boutures herbacées sont reconnues pertinentes pour la production de vitroplants. Par contre, les microboutures ligneuses sont généralement nécrosées et n'aboutissent pas à terme.

Pour l'étape de croissance, l'utilisation de la BAP à 1mg l^{-1} uniquement s'est avérée plus efficace qu'en présence d'ANA. L'emploi de l'ANA à 1mg l^{-1} et du charbon actif à 4g l^{-1} en association a permis l'induction du système racinaire. Un milieu sans auxine n'a pas favorisé le processus de rhizogénèse.

La réussite de l'acclimatation des vitroplants a été liée à la nature du substrat de culture ainsi qu'à la vigueur des racines. La production de plants greffés soudés de Citrus, par le greffage de vitroplants en serre, pourrait contribuer à l'amélioration du taux de plants greffés par les techniques traditionnelles. Par cette étude, nous pouvons conclure sur les possibilités de micropropagation des hybrides triploïdes par culture *in vitro* et aussi d'affirmer que le problème de stérilité gamétique de ces hybrides ne poserait pas de contraintes lors d'un programme de multiplication végétative.

Remerciements

Nos remerciements pour Messieurs Elyouri, M. et Rochdi, A. pour leurs collaborations.

Références bibliographiques

- Aaouine, M., Sedra, S.M., et Ounejjar, A. 1990. Multiplication in vitro de certains porte-greffes d'agrumes. Actes Inst. Agron. Vet. Vol 10. N° 4 : 11-17.
- Ange, R., Beauchesne, G., Boscon, G., Decortge, I., Digat, B., Galandrin, J. Cl., minier, R., Morand, J. Cl., et vidalie, H. 1984. La culture in vitro et ses applications horticoles. Ed. JB. Ballière, Paris. 152p.
- Barlass, M., et Skene, K.G.M. 1982. In vitro plantlet formation from Citrus species and hybrids. Sci. Hort. N° : 17 : 333-341.
- Eugenio, P.M.B., et Neftali, O.A. 1997. In vitro plant regeneration of Mexican Lime and mandarin by direct organogenesis. HortScience. Vol 32.N °: 5 : 931-934.
- Harada, H., et Murai, Y. 1996. Clonal propagation of Poncirus trifoliata through culture of shoot primordia. J.Hort. Sci. Vol 71. N°6 : 887-892.
- Hmouni, D. 2000. Recherche de nouveaux hybrides triploïdes de mandariniers et étude de la variation de certains paramètres de qualité du fruit de la clémentine Sidi Aïssa sous l'effet de l'interpollinisation. Thèse de Doctorat. Université Ibn Tofail. 150p.
- Juarez, J., Navarro, L., et Guardiola, J.L. 1985. Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentinier au moyen de la culture de nucelles in vitro. Fruit. Vol 31. N° 12 : 751-762.
- Juarez, J., Ortega, C., Navarro, A., Arregui, J.M. et Navarro, L. 1995. Endosperm and ovule culture as tools for ploidy level manipulation in Citrus. Preliminary results. SRA de Corse. Symposium Mandarins. 5 au 11 mars 1995.
- Khelifi-Slaoui, M., Ziane, N., et Khelifi, L. 1996. Essais de micropropagation du *Citrange Troyer* : Citrus sinensis L.x Poncirus trifoliata L. (Raf.). Ann. Agro. I.N.A. Vol 17. N°1 et 2 : 109-118.
- Maiza, F. 1980. Analyse des aptitudes organogénétiques de plusieurs variétés de Citrus en vue d'aboutir à leur multiplication végétative in vitro. Thèse de 3ème cycle. 76 p.
- Murashige, T., et Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. N°15 : 473-497.
- Nito, N., Yamaguchi, S., et Katayama, Y. 1996. New developments in Citrus Breeding. Technical. Bulletin. N°105 : 7-16.
- Normah, M.N., Hamida, S., et Ghani, F.D. 1997. Micropropagation of Citrus halimii- an endangered of South-east Asia. Plan. Cell. Tissue and Organ Culture. Vol 50. N° : 3 : 225-227.
- Ollitrault, P., Luro, F., Allent, V., et Dambier, D. 1995. Diversification des mandarines ; apport des biotechnologies pour la création de cultivars triploïdes aspermes. SRA de Corse. Symposium Mandarins. 5 au 11 mars 1995.
- Pasqual, M., Moreira, M.A., Ramos, J.D., et Antunes, L.E.C. 1995. Influence of benomyl on in vitro shoot multiplication and IBA rooting of 'Sunki' mandarin rootstock. SRA de Corse. Symposium Mandarins. 5 au 11 mars 1995.
- Ramos, J.D., Pasqual, M., et Antunes, L.E.C. 1995a. Immature seed germination : in vitro of Citrus Sunki Hort. Ex. Tan. Mandarin Rootstock. SRA de Corse. Symposium Mandarins. 5 au 11 mars 1995.
- Ramos, J.D., Pasqual, M., et Antunes, L.E.C. 1995b. The use of gibberelic acid in seed germination of Immature seed of 'Sunki' mandarin rootstock. SRA de Corse. Symposium Mandarins. 5 au 11 mars 1995.

Sim, G.E., Goh, C.J., et Loh, C.S. 1989. Micropropagation of Citrus Mitis Blanco. Multiple shoot formation and root explants in the presence of 6-benzylaminopurine. Plant Sci. N° 59 : 203-210.

Sarrantino, A. 1997. Citrus breeding . Conventional and modern techniques. Rivista di Frutticoltura ed ortofloricoltura. Vol 59. N° 12 : 7-15.

Sarrantino, A., et Caruso, A. 1987. Experience on the in vitro propagation of some Citrus rootstocks. Acta Horticulturae. Vol 212. N° 187 : 471-474.

Tanaka, R., et Ikeda, H.. 1983. Perennial maintenance of Haplopappus Gracilis ($2n=4$) by shoot tip cloning. Japanese. J. Genetics. N° 58 : 65-70.

Thomas, P., et Ravindra, M.B. 1997. Shoot tip culture in mango : influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. J. Hort. Scie. Vol 72. N° 5 : 713-722.