

Induction de l'embryogenèse somatique et régénération des plantules chez les mandariniers (*Citrus reticulata* L.)

*Handaji N.¹, Larsalane N., Lamarti A.², Dambier D.³,
Benyahia H.¹, Maiguizo H.^{1,2}, Cheikh O.Y.^{1,2},
et Ollitrault P.³*

1 PB. 257 INRA, Kenitra Maroc (nhandaji2002@yahoo.fr).

*2 Université Abdelmalek Essaadi, Faculté des Sciences,
93002 tetouan, maroc.*

*3 cirad flhor, ta50/ps4, 34398 montpellier cedex 5, france
(ollitrault@cirad.fr).*

Résumé

La callogenèse et l'embryogenèse somatique offrent de nombreuses perspectives pour les programmes d'amélioration génétique des variétés d'agrumes polyembryonnées via la mutagenèse, la fusion somatique et la transformation génétique. Cette étude a été conduite au laboratoire de l'INRA El Menzeh (Maroc) en collaboration avec le CIRAD-FLHOR, et elle s'est focalisée sur la maîtrise de l'induction des cals embryogènes chez les mandariniers. L'influence du génotype, la composition hormonale du milieu de culture in vitro et de la date de prélèvement des ovules ont été analysées. Les ovules de 4 variétés de mandarinier (Murcott, Cravo, Lee et Nadorcott) ont été prélevés durant 7 semaines après l'anthèse et mis en culture sur 4 milieux différents : MT (Murashig et Toker, 1969), MT + 1 mg L⁻¹ kinétine, MT + 1 mg L⁻¹ BAP et MT + 0.5 mg L⁻¹ BAP + 1 mg L⁻¹ 2,4-D. Les expérimentations réalisées mettent en évidence un effet marqué du génotype sur l'induction de cals embryogènes. Parmi les 4 milieux de culture testés, le milieu MT + 1 mg L⁻¹ de kinétine a donné les meilleurs résultats pour l'induction de cals embryogènes friables. Le milieu MT + 0.5 mg L⁻¹ BAP + 1 mg L⁻¹ 2, 4-D a induit la formation de cals compacts non embryogènes. La meilleure période de prélèvements des ovules pour l'induction des cals friables est de 5 semaines après l'anthèse. L'induction de l'embryogenèse somatique est obtenue sur un milieu MT sans hormones. Pour la régénération de plantules, le milieu favorable est celui de MT sans phytohormones ou additionné de 1 mg L⁻¹ ANA et 4 mg L⁻¹ charbon actif.

Mots clés : Agrumes, mandarinier, callogenèse, embryogenèse somatique, régénération des plantules.

ملخص

يتلخص هذا البحث في دراسة العوامل المساعدة على تكوين الساق الجنيني عند أربعة أصناف من المنذرين. النتائج المحصل عليها تبرز أن منذرين (مركوت هني) أعطت أكبر نسبة من الساق الجنيني بالإضافة أن الوسط (م1) الذي يساوي (م ت) (1969) زائد الهرمون الكنتيت (1مغ/ل)، جد ملائم لتكوين الساق الجنيني. كما لحظ فشل عملية إبراز الساق الجنيني عند المنذرين (ناذوركت). كما أن الوسط (م ت) المحتوي على الفحم النشط (4مغ/ل) زائد الهرمون أكسين (1مغ/ل) أتاح التجدير بنسبة عالية و تم حصر المدة لاستعمال البذيرة في 5 أسابيع بعد التلقيح.

الكلمات المفتاحية : الحوامض، المنذرين، الساق، الجنيني

Abstract

Callus induction and somatic embryogenesis are of interest to citrus improvement programs through mutagenesis, somatic fusion and genetic transfer. This study was carried out in the tissue culture laboratory of INRA El Menzeh (Morocco) with the collaboration of CIRAD FLHOR (France). The used explants are fertilized ovules of four polyembryonies mandarins (Lee, Cravo, Nadorcott and Murcott Honney). Ovules were extracted once a two weeks during 7 weeks, following anthesis and cultured on four different media (Murashig and Tucker (MT) containing or not different growth regulators). Differences were observed among cultivars with regard to percentage of responsive ovules, callus rate, embryogenesis capacity and plant regeneration rate. Ovules cultured on MT supplemented with 1mg l⁻¹ kinetin showed the high percentage of callus induction. Also, the friable embryogenic callus subcultured on MT without growth regulators allowed the induction embryo regeneration rate. The induction of embryogenic callus induction from ovules culture were obtained five weeks following anthesis. Also, plant regeneration is increased on hormone free MT media and on media with 1 mg l⁻¹ ANA and 4 mg l⁻¹ activated charcoal.

Key words : Variability - muskmelon (*Cucumis melo* L.) - correlations - Morocco.

Introduction

Chez les citrus, l'embryogenèse somatique directe ou indirecte offre de nombreuses perspectives pour la création variétale et la propagation des porte-greffes (Vardi et al., 1990 ; Ollitrault et al., 1995 et Khayri et al., 2001). Ces cals sont en particulier au cœur des projets d'amélioration des agrumes s'appuyant sur l'hybridation somatiques. Les protoplastes issus de ces cals apportent en effet l'aptitude à l'embryogenèse et à la régénération de plantules (Vardi et al. 1982 ; Kobayashi et al. 1988 et Grosser et al, 2000).

Les facteurs qui peuvent influencer la callogenèse et l'embryogenèse somatique sont multiples. Les potentialités callogène et embryogène apparaissent fortement différentes suivant le génotype (Kochba et al. 1972 ; Moore, 1985 ; Gmitter et Moore, 1986). Cette différence de réactivité est souvent corrélée au niveau de polyembryonie *in vivo* (Moore, 1985) et pourrait s'expliquer par des balances hormonales endogènes différentes. Ainsi, Tisserat et Murashige (1977 a) ont montré que la présence d'ovules de Cédratier (monoembryonné), inhibait l'embryogenèse somatique chez les cals de mandarinier Ponkan (polyembryonné) placés dans la même boîte de culture. Chez les Citrus, l'induction de cals embryogènes a été obtenue chez de nombreuses espèces, telles que *C. grandis*, *C. aurantifolia*, *C. medica*, *C. limon*, *C. madirensis*, *C. paradissi*, *C. reticulata* (Sabharwal, 1963 ; Murashig and Tucker, 1963 ; Chaturvedi et Mitra, 1975 ; Moore, 1985 ; Gill, 1992 ; Gill et al., 1994). La nature et l'âge des explants ont aussi une influence considérable sur la nature de la réaction. Mitra et Chaturvedi (1972) ont obtenu des embryons somatiques *in vitro* à partir d'ovules fécondés d'espèces de Citrus polyembryonnées, puis d'ovules non fécondés (Kochba et Soiegel Roy, 1973 ; Ollitrault et al. 1992). Mais, la fécondation ne paraît pas nécessaire à la prolifération d'embryons *in vitro*, à partir d'ovules de cultivars polyembryonnés. Ceci est confirmé par les résultats obtenus par d'autres auteurs pour des prélèvements d'ovules au stade anthèse (Kobayashi et al., 1984), au stade jeune fruit (Button et Borman, 1971 ; Kochba et al., 1972) ou au stade fruit mature (Starrantino et Russo, 1980). La culture *in vitro* d'ovules non développés extraits d'oranges ou de citron mûrs produit des embryons nucellaires, des plantules et occasionnellement des cals embryogéniques (Starrantino et Russo, 1980 ; Moore, 1985 ; Gmitter et Moore, 1986). Chez les Citrus, de nombreux milieux de culture ont été utilisés. Les hormones (cytokinine et auxine) favorisent l'induction des cals embryogènes (Starrantino et Caponnetto, 1990 ; Carimi et al. 1998 et 1999 et Tao et al. 2002).

L'étude présentée dans cet article se place dans le cadre du programme d'amélioration des variétés d'agrumes lancé par l'INRA Maroc ciblant deux principaux objectifs qui sont la création de variétés de mandarinier triploïdes via la fusion somatique et la production des plants sains à partir de cals embryogènes (Donghia et Djelouah, 2000). Afin d'optimiser la gestion de l'embryogenèse somatique, l'influence de trois facteurs sur l'induction de cals embryogènes à partir d'ovules de mandariniers a été analysée. L'aptitude à régénérer des plantules à partir des cals embryogènes a également été étudiée.

Matériel et Méthodes

Matériel végétal

Les travaux portent sur 4 variétés de mandarinier (*C. reticulata L.*). Cette espèce, génétiquement diversifiée, présente généralement une bonne aptitude à l'embryogenèse somatique (Ollitrault et al. 1992). Elle est au cœur des programmes de diversification des petits agrumes qui prennent une place croissante sur le marché des agrumes frais. Les variétés de mandariniers retenues dans cette étude, issues des arbres de la collection d'El Menzeh, sont Murcott honey (tardive et gros calibre), Nadorcott (tardive et bonne qualité), Cravo (précoce et juteuse) et Lee (précoce, avec des fruits de gros calibre).

Dates de prélèvement des explants

Les fleurs en pollinisation libre sont prélevées avant ou après l'anthèse selon les cinq dates suivantes (Figure 1). D1 : avant ouverture des fleurs ; D2 : une semaine après l'anthèse ; D3 : trois semaines après ; D4 : cinq semaines après et D5 : sept semaines après la fécondation.

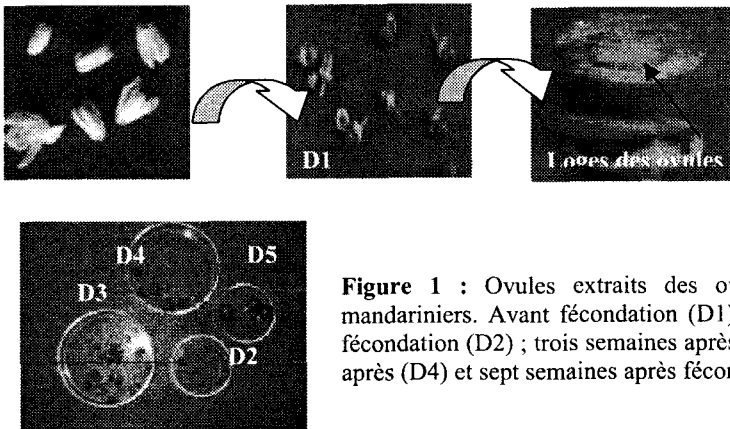


Figure 1 : Ovules extraits des ovaires des fleurs de mandariniers. Avant fécondation (D1) ; une semaine après fécondation (D2) ; trois semaines après (D3) ; cinq semaines après (D4) et sept semaines après fécondation (D5).

Composition des milieux de culture

Les ovaires sont trempés dans l'alcool à 70° pendant 2 minutes puis dans l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 10 minutes et ensuite rincés trois fois à l'eau distillée stérile. Les ovaires sont ensuite ouverts avec un scalpel fin sous une loupe binoculaire et les ovules sont isolés et placés dans des boîtes de Petri contenant le milieu de culture solidifié par l'agar (9g/l⁻¹). Le milieu de culture de base est celui de MT (Murachige et Tucker, 1969), complé-menté de 50 g/l⁻¹ de saccharose et de 500 mg/l⁻¹ d'extrait de malt. Le milieu a été adopté suite aux très bons résultats obtenus au niveau de CIRAD-FLHOR France (Commun personnel). Pour l'induction de la callogenèse, quatre compositions hormonales ont été testées (Tableau 1) :

Tableau 1 : Composition des milieux testés pour l'induction de la callogenèse par culture d'ovules

Codes	Milieu de base	Hormones	mg/l
M1	MT	-	-
M2	MT	Kinétine	1
M3	MT	BAP	1
M4	MT	2,4 D + BAP	1 + 0,5

Pour chaque combinaison (génotype/milieu), 4 répétitions sont réalisées à raison de six boîtes de Petri contenant chacune 20 ovules par répétition.

Les boîtes de Petri contenant les ovules ont été placées dans une chambre de culture à 26±1°C et à l'obscurité. Après un à deux mois, les cals friables sont isolés pour être multipliés sur le milieu d'induction initiale pendant cinq mois, puis ils sont transférés dans des tubes à essais contenant 15ml du milieu MT sans phytohormones. Les embryons sont ensuite prélevés et placés individuellement sur le milieu de base MT avec ou sans phytohormone pour favoriser leur germination en tube à essai. Les jeunes plantules dotées d'une racine pivotante, de cotylédons développés et d'une pousse feuillée (2 à 3 feuilles) sont transférées sur un milieu favorisant le développement racinaire et l'élongation de la partie aérienne. Les trois milieux testés sont : M1 (MT), M5 (MT + 1 mg L⁻¹ ANA) et M6 (MT + 1 mg L⁻¹ ANA + 4 mg L⁻¹ charbon actif).

Acclimatation des vitroplants

Les vitroplants enracinés passent par une phase d'endurcissement pour les préparer à l'étape d'acclimatation. Cette phase consiste à ouvrir les tubes à essais, à nettoyer les racines contenant le milieu de culture solidifié par l'agar et à fermer ces tubes par du coton. Cette étape dure une trentaine d'heures à température ambiante. Chaque plantule, est ensuite repiquée dans un pot contenant un mélange de sable stérile et de terreau (1 : 1, v / v), et placée sous serre à une température de 27±1°C et une humidité relative de 80%. Les pots sont recouverts par un parafilm pendant 3 semaines à un mois afin de maintenir une forte hygrométrie autour de la jeune plantule. Les plantules sont ensuite greffées sur le Citrange troyer. .

Les données sont analysées par l'ANOVA et la petite différence significative a été utilisée pour séparer les moyennes.

Résultats et Discussions

Callogenèse

a/ Effet de la date de prélèvement

L'induction des cals n'a été possible qu'à partir des fleurs récoltées au moins trois semaines après anthèse et la date de prélèvement des ovules ayant produit les meilleurs résultats (87%) est de 5 semaines après anthèse (Figure 2). Nos résultats sont différents de ceux obtenus par Ollitrault et al. (1992). Ces auteurs ont obtenu des inductions de cals sur des ovules prélevés au moment de l'anthèse et ont observé les meilleurs taux d'induction de cals embryogènes pour les ovules prélevés 3 semaines après anthèse. Ceci peut être lié en partie à la nature différente des génotypes utilisés dans ces deux études et à la morphologie et dimension des fleurs variables selon les variétés et selon les espèces. Les variétés utilisées dans notre étude sont des mandariniers (*Citrus reticulata* L.) pour lesquelles le prélèvement des ovules à un stade précoces a été très délicat en raison du petit diamètre de l'ovaire d'une part et des ovules d'autre part. Outre ces aspects anatomiques, il est probable que les balances hormonales endogènes au sein des ovules varient en fonction des génotypes et des conditions environnementales, et ne permettant pas de tirer des règles générales sur les meilleures périodes de prélèvement pour induire des cals embryogènes.

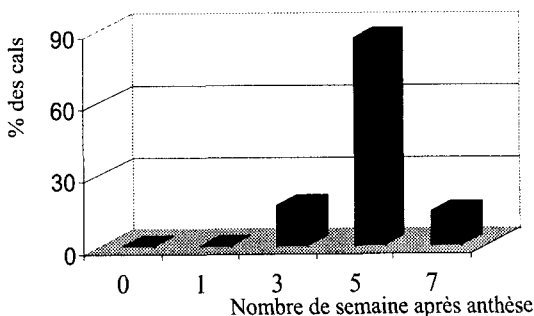


Figure 2: Effet de la date de prélèvement des ovules sur le pourcentage d'induction des cals

b/ Effet du génotype

Le pourcentage de callogenèse varie de 7 à 61% selon les cultivars ; la différence étant significative. Les résultats les plus élevés ont été obtenus chez les mandarines Murcott honey (61%), suivie par Cravo (54%) et par Lee (38%). La variété Nadorcott a par contre manifesté une très faible aptitude à produire des cals à partir des ovules (Tableau 2). Cette différence de réactivité entre cultivars a aussi été constatée par de nombreux auteurs (Kochba et al. 1972 ; Gmitter et Moore, 1986 et Bugam et al. 2003). Elle est souvent corrélée au niveau de

polyembryonie *in vivo* des cultivars et pourrait s'expliquer par des balances hormonales endogènes différentes (Gmitter et Moore, 1986).

La variété Nadorcott, qui est un hybride de la Murcott honey (Handaji et al. 2004), est une variété tardive de très haute qualité et son utilisation comme géniteur pour la diversification des petits agrumes au niveau triploïde est prometteuse. L'utilisation de cette variété en hybridation somatique est envisageable à partir de protoplastes de feuilles combinés à des protoplastes de cals embryogènes pour d'autres parents. Toutefois, l'optimisation de son exploitation nous incite à engager de nouvelles études pour identifier les conditions favorisant l'induction de cals embryogènes chez cette variété. Il est à noter que la date d'initiation des cals après la mise en culture *in vitro* d'ovules est aussi variable selon le génotype : 15 à 20 jours pour la Murcott Honey, 25 à 35 jours pour la Cravo 30 à 45 jours pour Lee et Nadorcott. Les cals issus de la Murcott et Lee présentent des textures plus friables et avec des colorations, respectivement, brunâtre et blanchâtre (Figure 3).

c/ Effet de la composition hormonale

Le pourcentage de cals induits a varié avec la composition hormonale du milieu de culture et la différence est significative (Tableau 2). Le milieu de base MT a engendré la plus faible induction de cals chez toutes les variétés (2 à 12%). Les meilleurs résultats d'induction des cals ont été obtenus sur les deux milieux M2 contenant 1 mg L⁻¹ Kinétine et M4 contenant 1 mg L⁻¹ de 2-4 D et 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Les types de cals obtenus sur ces 2 milieux sont toutefois très différents. La présence de kinétine dans le milieu de culture des ovules semble stimuler fortement la réactivité des ovules des mandarines (*Citrus reticulata*) avec une productivité de cals blancs ou bruns friables et embryogènes. Dans le cas du 2-4-D + BAP, les cals sont verts compacts et non embryogènes. De même, Gil et al. (1994 et 1995) ont rapporté que le 2-4-D favorise la formation de cals non embryogènes chez le mandarinier Kinnow. Une étude histologique de l'évolution des ovules en culture réalisée par Cabasson et al. (1993) a montré que les cals friables sont issus de cellules méristématiques du nucelle tandis que les cals compacts proviennent des cellules tégumentaires vacuolisées. Le milieu M3 (MT+ 1 mg l⁻¹ BAP) favorise également l'obtention de cals friables avec toutefois un pourcentage relativement faible par rapport au milieu M2. Le milieu MT + 1 mg L⁻¹ kinétine a ainsi été retenu pour l'induction de cals embryogènes.

Pour la variété Nadorcott, le pourcentage des cals est resté faible sur les quatre milieux. De ce fait, la recherche d'autres types d'explants ou de milieux de culture sont à tester pour induire des cals embryogènes. Carimi et al. (1998 et 1999) ont réussi à induire des cals à partir de variétés d'agrumes réputées récalcitrantes par culture de style et de stigmates.

A noter que nous n'avons observé d'interaction significative entre le génotype et la composition hormonale du milieu de culture contrairement à d'autres auteurs (Ollitrault et al. 1992; Calovic et al. 2000). Ceci est probablement dû au fait que nous avons travaillé sur une seule espèce (*C. reticulata*) alors que l'étude d'Ollitrault et al. (1992) était conduite sur plusieurs espèces.

Tableau 2 : Pourcentage de callogenèse selon les variétés de mandariniers et la composition hormonale des milieux de culture.

Milieux de cultures	Murcott	Nadorcott	Lee	Cravo	Moyenne
M1	12 c	2 b	7 c	5 c	7 c
M2	98 a	12 a	66 a	90 a	67 a
M3	42 b	3 b	25 b	35 b	26 b
M4	90 a	10 a	54 a	86 a	60 a
Moyenne	61 a	7 b	38 b	54 a	40 a

Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à 5%.

Les valeurs représentent la moyenne de 4 répétitions par variété et par milieu de culture à raison de six boîtes de Pétri contenant chacune 20 ovules par répétition.

Embryogenèse somatique et régénération des plantules

L'embryogenèse a eu lieu après quatre repiquages mensuels des cals friables sur le milieu de culture MT dépourvu d'hormones (M1). L'aptitude à produire des embryons varie selon les géotypes. La Murcott honney présente un pourcentage d'embryogenèse somatique significativement supérieure aux autres géotypes (86%), et est suivi par Cravo (56%) (Tableau 3). Dans notre cas, les régulateurs de croissance ne sont pas nécessaires pour le développement des embryons somatiques car les cellules nucellaires ont une tendance naturelle à l'embryogenèse. Button et Kochba (1977) et Kochba et Spiegel Roy (1977) ont rapporté qu'après plusieurs repiquages, le cal devient autotrophe par rapport aux régulateurs de croissance. Sur des cals plus âgés, l'utilisation du galactose à la place du saccharose et l'augmentation des concentration d'Agar dans le milieu favorisent très significativement l'embryogenèse (Ollitrault et al, 1995).

Les embryons somatiques sont en général d'origine unicellulaire (Ollitrault et al. 1995). Ils passent successivement par différents stades morphologiques très caractéristiques : stade globulaire, torpille, cordiforme, cotylédonaire et bipolaires avec une radicule et des cotylédons bien différenciés, rattachés à un hypocotyle volumineux. Pour la régénération des plantules, les trois milieux testés (M1, M5 et M6) ont permis de donner naissance à de jeunes plants avec ou sans racines (Figure 4). Ainsi, l'auxine a favorisé la régénération des plantules et le charbon actif a plutôt favorisé l'enracinement. Ces résultats concordent avec ceux de Hmouni et al. (2000).

Tableau 3 : Pourcentage d'embryogenèse somatique et de plantules régénérées chez les trois mandariniers.

Milieux de culture	% des cals produisant des embryons	% des plantules régénérées avec racines		
		M1	M5	M6
Murcott honney	86 a	50 a	12 a	80 a
Lee	28 b	20 b	6 a	68 a
Cravo	56 a b	38 b	10 a	71 a
Moyenne	43	27	07	55

(M1 = MT ; M5=MT + 1 mgL⁻¹ ANA ; M6=MT + 1 mgL⁻¹ ANA + 4 mgL⁻¹ charbon actif).

Les valeurs portant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à 5%.

Les valeurs représentent la moyenne de 4 répétitions par variété et par milieu de culture à raison de six boîtes de pétri contenant chacune 20 ovules par boîte de pétri.

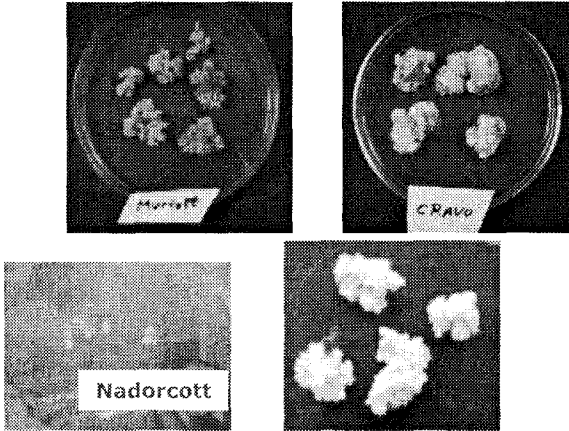


Figure 3: Induction des cals chez les quatre variétés de mandariniers dans le milieu de MT contenant 1mg/l de la Kénitine (Deux mois après la mise en culture in vitro des ovules)

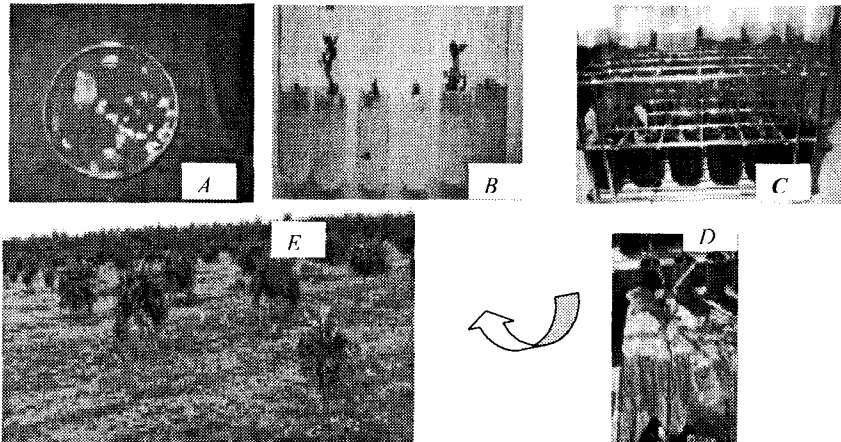


Figure 4: Induction de l'embryogenèse somatique indirecte chez le mandarinier, Excision des embryons somatiques (A), Plantules régénérées sur le milieu M5 (MT+ 1mg/l ANA) (B), M6 (MT+ 1mg/l ANA) et 4 mg/L

Conclusion

Il ressort de cette étude que l'induction des cals embryogènes est fonction du génotype utilisé. Ainsi, la variété Murcott honey s'est démarquée des autres par sa très forte aptitude à produire des cals embryogènes alors que le résultat est nul pour le mandarinier Nadorcott. Les phytohormones ajoutées au milieu jouent aussi un rôle primordial dans l'évolution des explants. La kinetine (1mg l^{-1}) a favorisé l'induction de cals friables embryogènes tandis que le 2,4-D plus BAP a produit des cals compacts non embryogènes. Dans les conditions de notre expérimentation et pour les génotypes testés, la meilleure date de prélèvement des ovules est 5 semaines après l'anthèse. Les embryons ont été obtenus à partir des cals friables en les repiquant sur un milieu MT dépourvu de phytohormones. Ainsi, la présence ou l'absence de cytokinine permet d'orienter les lignées de cals soit vers la multiplication indifférenciée soit vers la production d'embryons. La régénération des plantules est ensuite obtenue sur les milieux MT seul ou contenant l'ANA et le charbon actif. L'optimisation de la gestion des cals embryogènes d'agrumes permettra d'appuyer le programme de création de nouvelles variétés de mandariniers triploïdes (aspermes) par hybridation somatique. La variété Murcott honey pourrait ainsi être la première variété utilisée à l'INRA Maroc pour l'isolement de protoplastes en raison du fort potentiel embryogène de ses cals. En revanche, des travaux additionnels sont nécessaires pour mettre au point l'embryogenèse somatique chez le mandarinier Nadorcott (commercialisé sous nom d'Afourer).

Remerciements

Nous remercions Dr Abousalim M. (Professeur à l'IAV Hassan II, Rabat) pour toutes les corrections apportées à ce document.

Références bibliographiques

- Bugam F., M. N. Amin, S. Islam, M. A. K. Azard and M. M. Rehman. 2003. *in vitro* plant regeneration from cotyledon derived callus of three varieties Pummelo (*C. grandis*). Online Journal of biological Science 3 (8): 755-759.
- Button J. and CH. Borman, 1971. "Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange *in vitro*." J. S. Afric. Bot., 37, 127-134.
- Button, J. and Kochba, J. 1977. Tissue culture in the citrus industry. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Reinert, J. and Bajaj, Y. P.S. (Eds.). Springer-Verlag.
- Cabasson C., 1993. Régénération de la mandarine commune par l'embryogenèse somatique en milieu liquide. Fusion somatiques et essais de transformation génétique. Thèse doctorale (Université de Montpellier II, France, 124p.
- Calovic M., Z. Vilorja, B. Nielsen, F. G. Gmitter, J. W. S. Castle and J. W. Grosser. 2000. Somatic embryogenesis from lemon styles and analysis of genetic stability in regenerated plants using RAPD and flow cytometry. International society of citriculture congress 2000 Florida pp.114.
- Carimi F., M. C. Tortorici, F. De pasquale and F. Guilio. 1998. somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigmat/style explants of sweet orange navel group. Plant cell, tissue and organ culture. 54: 183-189.
- Carimi F. F., De pasquale and F. G., Crescimanno. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of citrus. Plant cell reports 18: 935-940.
- Chaturvedi H.C. and G. C. Mitra, 1975. A shift in morphologic pattern in citrus callus tissue during prolonged culture. Ann Bot., 39: 683-687.
- Donghia A.M. and K. Djelouah. 2000. somatic embryogenesis from style culture: A new technique for the sanitation, conservation and stage exchange of citrus germplasm. International society of citriculture congress 200 Florida .
- Gill M. I .S. 1992. Studies on somatic cell and protoplast culture in mandarin. PhD thesis. Punjab Agricultural university Ludhiana.
- Gill M. I. S., Z. Singh, B. S. Dhillon and S. S. Gosal. 1994. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration on callus derived from seedling explants of kinnow mandarin. Journal Hort Science 69: 231-236.
- Gill M.I.S., Z. Singh, B.S. Dhillon S.S. Gosal. 1995. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin. Scientia horticulturae 63: 167-174.
- Gmitter F. G. et Moore G. A., 1986. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryonic calli of Citrus: Embryon production, germination and plant survival. Plant. Cell. Tissue and Organ Cultur. N 6: 139-147.

Handaji N., J. M. Leitao, and J. Carlier. 2004. DNA analysis of Citrus cultivars from INRA Morocco germplasm with Inter Simple Single Repeat markers. International society of citriculture congress p.114.

Hmouni D., Handaji N., Arsalane N. et Rachidi M.. 1999. Microbouturage *in vitro* et greffage *in vivo* des plantules triploïdes de Citrus. Al Awamia N° 101 p : 9-24.

Khayri J. M. And M. Albahray. 2001. *in vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia*. Current science, vol 81, p124-1246.

Kobayashi S., Fujiwara K., Oiyama I., Ohgawara T. and Ishii S.1988. "Somatic hybridisation between Navel orange and Murcott Tangor". International Citrus Congress.

Kobayashi S., Ieda I. and Nakatani M.. 1984. "Role of the primordium cell in nucellar embryogenesis in citrus". Proc. Int. Soc. Citriculture, 44-48.

Kochba J., Spiegel Roy P. and Safreu H. 1972. « Adventive plant from ovules and nucelli in citrus. » Planta berl. 106, 237-245.

Kochba J. and Spiegel Roy P. 1973. Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of shamouti orange, 69, 156-162.

Kochba J. and Spiegel Roy P. , 1977. The effect of auxins, cytokinines and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*) . Z. Pflanzenphysiol. 81, 283-288.

Mitra G. C. and Chaturvedi H.C., 1972. Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vivo*-grown emasculated flower buds of *Citrus spp*. Bull. Torrey Bot. Club., 99, 184-189.

Moore, 1985. Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature Citrus fruit. J. Amer. Soc. Hort.; Sci., 110(1), 66-70.

Murashige T. and Tucker D. P. H., 1969. "Growth factor requirements of citrus tissue culture." Proceeding first international citrus symposium. Vol 3.

Ollitrault P et D.R. Serra. 1992. L'amélioration des agrumes: II- Créations variétales et biotechnologies. Fruits, Numéro spécial Agrumes, pp.124-134

Ollitrault P., Dambier D., Cabasson C., Allent V. et Engelmann F. 1995. Optimisation de la gestion des cals embryogènes d'agrumes pour leur exploitation en création variétale. Revue Fruit, vol.49 (5-6), pp.477- 480

Ollitrault P. et Michaux Ferriere N., 1992. Etude critique de la technique de cytométrie en flux appliquée à l'amélioration des plantes. Résultats obtenus pour quelques agrumes. Fruits, Numéro spécial Agrumes (47), p.195-203.

Ollitrault P., Ollitrault F. et Cabasson C. 1992. Induction des cals embryogènes d'agrumes par culture d'ovules. Détermination isoenzymatique de l'origine tissulaire des embryons. Revue Fruit : Numéro spécial agrume (47), pp : 204 - 212.

Sabharwal, P.S., 1963. *in vitro* culture of ovule, nucelli and embryo of citrus reticulata var 'Nagpuri Swingle. Plant tissue and organ culture. International society of plant morphology. Pp: 255-274.

Starrantino A. And Russo F., 1980. Seedling from undeveloped ovules ripens fruits of polyembryonic citrus cultivars. Hort. Science, 15 (3), 296-297.

Starrantino A. and Caponnetto P. 1990. Effect of cytokinins on embryogenic callus formation from undeveloped ovules of orange. Acta Hort Gen. 4: 311 – 313.

Starrantino A. Licretti S., Russo G., Raciti M., Reforgiato. 1992. "Embryogenic callus formation, protoplast regeneration and somatic fusion of different citrus species." VII international citrus congress.

Tao H., P. Shaolin, D. Gaofeng, Z. Lanying and L. Gengguang. 2002. Plant regeneration from leaf derived callus in citrus grandis (Pummelo): Effect of auxines in callus induction medium. Plant cell tissue and organ culture 69: 141-146.

Tisserat and Murashige, 1977a. "Probable identity of substances in citrus that repress asexual embryogenesis". *In vitro*, 13, 785-789.

Tisserat and Murashige, 1977b. "Repression of asexual embryogenesis *in vitro* by some plant growth regulators. *in vitro*, 13, 799-805.

Vardi A., Bleichman S. et Aviv D., 1990. Genetic transformation of Citrus protoplasts and regeneration of transgenic plants. Plant. Sci. N 69: 199-206.

Vardi A. and Spiegel-Roy P., 1982. "Plant regeneration from Citrus protoplasts: variability in methodological requirements among cultivars and species. Theor. Appl. Genet., 62, 171-176.