



## Optimisation de l'induction de callogenèse à partir des embryons excisés de mandariniers (Citrus spp.)

Label Kawtar<sup>1/2</sup>, Handaji Najat<sup>1</sup>, Brhadda Najiba<sup>2</sup>, Arsalane Najat<sup>1</sup>, Gmira Najib<sup>2</sup>, Essalhi Elmustapha<sup>1,2</sup>, Aderdour Tarik<sup>1/2</sup>, Benyahia Hamid<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> : Institut National de La Recherche Agronomique, CRRRAK, El Menzeh

<sup>2</sup> : Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, Laboratoire de Biodiversité et Ressources Naturelles, Kénitra (Maroc).

Email : [nhandaji2002@yahoo.fr](mailto:nhandaji2002@yahoo.fr)

Original submitted in on 25<sup>th</sup> February 2015. Published online at [www.m.elewa.org](http://www.m.elewa.org) on 30<sup>th</sup> May 2015  
<http://dx.doi.org/10.4314/jab.v89i1.4>

### RÉSUMÉ

*Objectif* : Actuellement, l'amélioration des agrumes vise entre autres la diversification variétale des petits agrumes sur des critères d'étalement de la production et d'amélioration des qualités organoleptiques et nutritionnelles, et une aptitude à la production de fruits de qualité. Ainsi l'augmentation de la variabilité génétique via la callogenèse est le principal objectif de cette étude. Dans ce sens, la détermination des conditions optimales d'induction de la callogenèse selon les milieux de culture et les génotypes constitue l'étape préliminaire de ce travail.

*Méthodologie et résultats* : la culture des cals a été initiée à partir des embryons excisés de six variétés de mandariniers (Anana, Lee, Murcott, Nadorcott, Temple, Ortanique) sur le milieu de base de Murashig et Toker (MT). Différentes concentrations de régulateurs de croissance ont été testées afin d'obtenir le meilleur développement des cals : MT+ 1mg/l 2,4D + 0,5mg/l Glutamine, MT+ 1mg/l 2,4D + 0,5mg/l Asparagine, MT+1mg/l 2,4D +0,5mg/l BAP, MT+ 1mg/l 2,4D + 0,5mg/l ANA, MT+ 1mg/l 2,4D + 0,5mg/l kinétine.

*Résultats et discussion* : Aucune réactivité n'a été observée sur le milieu de base MT sans régulateurs de croissance chez toutes les variétés. Ainsi, la concentration du régulateur de croissance a un effet significatif sur l'induction de cals, la croissance et la texture. La fréquence la plus élevée d'induction de cals a été observée sur le milieu de culture MT contenant les hormones de croissance 2-4 D/ BAP (1/0,5 mg/l). Les essais pratiqués ont révélé que les cals peuvent apparaître au bout de huit jours à l'obscurité. Les cals obtenus, sont friables, noduleux crémeux et blanchâtres chez les variétés Nadorcott, Temple, Ortanique et Murcott. Tandis que les variétés Anana et Lee représentent des cals brunâtre et compacts.

*Conclusion et Application des résultats* : Ces résultats mettent en évidence la grande aptitude de la callogenèse dans le milieu MT contenant 1 mg/l 2-4 D + 1 mg/l BAP. Les cals friables obtenues seront repiqués dans d'autres milieux favorables pour l'induction d'embryogénèse somatique et puis la régénération des plantules. De plus, la maîtrise de callogénèse pourrait servir le programme de fusion de protoplastes.

**Mots Clés** : Agrumes, mandarinier, callogenèse, variation somaclonale.

## ABSTRACT

**Objective:** Currently, improving citrus aims at varietal diversification on based on production and improvement of organoleptic and nutritional qualities, and ability to produce quality fruit. Thus, the increase in the genetic variability via callogenesis is the main objective of this study. Determination of optimal conditions for induction of callus according to culture media and genotypes is preliminary stage of this work.

**Methodology and Results:** Culture of callus was initiated from embryos excised from six varieties of mandarin (Anana, Lee, Murcott, Nadorcott, Temple and Ortanique) on basal medium of Murashig Taker (MT). Different concentrations of growth regulators were tested to obtain the best development of callus: MT + 1mg /l 2,4-D + 0.5mg /l glutamine, MT + 1mg /l 2,4-D + 0.5 mg /l asparagine, MT + 1mg /l 2,4-D + 0.5 mg /l BAP, MT + 1mg /l 2,4-D + 0.5 mg /l NAA, MT + 1mg /l 2,4-D + 0.5 mg /l kinetin,

**Results and Discussion:** No reaction was observed in the basal medium without growth regulators MT in all varieties. Thus, the concentration of the growth regulator has a significant effect on the induction of callus growth, and texture. The highest callus induction frequency was observed in the culture medium containing the MT growth hormones 2-4 D / BAP (1 / 0.5 mg /l). Tests carried out showed that callus might appear after eight days in the dark. The calluses obtained are friable, nodular and creamy white in Nadorcott, Temple Ortanique and Murcott varieties, while cultivars Lee and Anana represented brownish compact callus.

**Conclusion and Application of results:** These results highlight the great ability of the callus in the MT medium containing 1 mg /l 2-4 D + 1 mg /l BAP grown for eight days in the dark. Friable callus obtained will be planted in other medium favourable for somatic embryogenesis induction and seedling regeneration

**Keywords :** Citrus, mandarin, callogenesis, somaclonal variation.

## INTRODUCTION

Au Maroc, le secteur agrumicole compte parmi les principales filières de production et joue un rôle important sur le plan socio-économique par la valeur ajoutée qu'elle génère et le nombre de journées de travail qu'elle offre annuellement. Sur un marché des fruits frais très concurrentiel, les petits agrumes, telles que les mandarines et les clémentines sont aujourd'hui l'un des secteurs les plus dynamiques de la production et des échanges mondiaux d'agrumes. De même, elles ont su gagner la préférence des consommateurs. Dans ce sens, la recherche de nouvelles variétés productives et de bonne qualité permettrait d'augmenter la popularité des consommateurs en proposant des produits sans pépins, faciles à peler et cultivables toute l'année. Parmi les méthodes d'amélioration génétique, l'induction *in vitro* de callogenèse est une étape fondamentale à maîtriser pour mieux exploiter la fusion des protoplastes et la variation somaclonale. Elle était largement étudiée au cours de ces dernières années pour beaucoup de plantes d'intérêts économiques. Chez les citrus,

l'embryogenèse somatique directe ou via la callogenèse offre de nombreuses perspectives pour la création variétale et la propagation des porte-greffes (Vardi et al., 1990 ; Ollitrault et al., 1995 ; Carimi et al., 1998 et 1999 ; Khayri et al., 2001 ; Dutt et Grosser, 2009 et Grosser et al., 2009). Les potentialités calogènes et embryogènes apparaissent fortement différentes suivant le génotype, et dans une moindre mesure en fonction du stade de prélèvement. Cette différence de réactivité entre cultivars avait déjà été constatée par de nombreux auteurs (Kochba et al., 1972 ; 1976 ; Moore, 1985 ; Gmitter et Moore, 1986, Handaji et al., 2005). Elle est souvent corrélée au niveau de polyembryonie *in vivo* de cultivars et pourrait s'expliquer par des balances hormonales endogènes différentes (Moore, 1985). Chez les Citrus, la culture des cals a été obtenue à partir de nombreuses espèces, telles que grandis, aurantifolia, medica, limon, madirensis, paradissi, reticulata (Sabharwal, 1963 ; Murashig and Tucker, 1963 ; Chaturvedi et Mitra, 1915 ; Moore, 1985 ; Gill, 1992 ; Gill et al.,

1994 ; Tao et al., 2002). Le développement des cals embryogènes est le point de départ pour l'isolation des protoplastes et la régénération des plantules (Vardi et al,1982 ; Kobayashi et al,1988 et Starrantino et al., 1992). De même, la recherche de la variation somaclonale est exploitée sur les agrumes, pour sélectionner des porte greffes résistants et tolérants à la salinité (Beloualy et Bouharmont, 1992 ; Bouharmont, 1996 ; Bougarfaoui, 1987 ; Abousalim et al, 2002, et Beniken et al 2013). Aussi, l'induction des cals a été initiée à partir des ovules des mandariniers (Handaji et al., 2005, Ollitrault et al 1992, B. Singh1 et al 2006,) ; des embryons excisés des porte greffes d'agrumes (Benyahia et al., 2012, Ramdan et al, 2014, El yacoubi et al 2010 ; Nafees Altaf et al 2009), des fragments des feuilles (Nafess Altaf et al,

2009). D'après Lutz (1985) et Nozeran (1985), l'initiation de la callogenèse semble être due au bouleversement du comportement des explants. La présente étude vise à déterminer les conditions optimales de callogenèse à partir d'embryons excisés de six variétés de mandariniers (Nadorcott, Ortanique, Lee, Murcott, Temple). La présente étude est menée dans le cadre du programme d'amélioration des Variétés d'agrumes lancé par l'INRA Maroc dont l'objectifs est de Déterminer le milieu favorable pour l'induction des cals des différentes variétés de mandariniers (Nadorcott, Ortanique, Lee, Murcott, Temple) à partir des embryons excisés, ce qui va nous permettre de Comparer la capacité d'induction de callogenèse ; selon différentes combinaisons hormonales ainsi selon la diversité variétal.

## MATERIEL ET METHODES

**Matériel végétal :** L'étude a porté sur les graines issues de fruits mûrs de sept mandarines (Tableau1). Les échantillons sont récoltés au niveau de la collection d'agrumes de l'INRA El Menzeh. Cette récolte s'est effectuée sur une période de quatre mois courant Novembre – Février. L'expérimentation de la culture *in*

*vitro* a été réalisée dans le laboratoire de l'unité de recherche d'amélioration et conservation des ressources phylogénétique de l'INRA Kenitra. L'explant, représenté par les embryons excisés, est prélevé à partir des graines matures de différentes variétés.

**Tableau 1 :** Liste des variétés de mandarinier utilisées

	Variétés de mandarinier		
	Nom	Parents	Intérêt
Tardives	Nadorcott (Afourer) Ortanique Anana Murcott (Tangor)	<i>Murcott Honney X unknown</i> (2) <i>C. sinensis X tangerine</i> (3) <i>C. reticulata Blanco</i> (3) <i>C. reticulata X C. Sinensis</i> (1)	Commercial Commercial Ressources génétiques Ressources génétiques
Saisons	Temple (Tangor) Lee	<i>C. reticulata X C. sinensis</i> <i>C. paradisi X tangerine</i> (3)	Ressources génétiques Ressources génétiques

Légende : (1): Gogorcena et al. (1990); (2): Handaji et al. (2004) ; (3): EGID (2003)

**Désinfection et préparation de l'explant :** Les graines ont subi un trempage rapide dans l'éthanol 70 % (v/v) pendant 5min, suivi de l'immersion pendant 10min dans l'hypochlorite de calcium 10 % (m/v). Ensuite les graines subissent trois rinçage, successive dans l'eau distillée stérile, les graines ont été débarrassées de leurs téguments, A l'aide d'une pince et d'un scalpel l'embryon a été isolé. Toutes ces opérations ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire.

**Préparation et incubation des milieux de culture :** Pour toutes les expériences réalisées, le milieu de base

est celui de (Murashige et Tucker, 1969). Cinq compositions ont été testées dont le milieu témoin (M0) est dépourvu d'hormone, alors que les autres milieux contenant tous 1mg/L de l'auxine 2,4-D (Acide 2,4-Dichlorophénoxy) acétique) ou C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, se différencient par l'addition d'une cytokénine BAP (6-benzylaminopurine) et la Kinétine ; de l'auxine ANA (Acide *Naphtalène* ...) ou des acides aminés non polaires (Glutamine et asparagine) (Tableau 2). Tous les milieux utilisés dans cette étude ont été stérilisés à autoclavage à 121°C, sous une pression de 1 bar pendant 30 minutes. Puis, ont été

répartis sous la hotte en raison de 25ml / boîte de Pétri. Pour la culture et la conservation des cals, ils ont été

repiqués une fois tous les 15 jours dans le même milieu de culture.

**Tableau2 :** Composition des milieux de culture testés

Milieu	Concentration
<b>M0</b>	MT
<b>M1</b>	MT+1mg/l 2,4D + 0,5mg/l Glutamine
<b>M2</b>	MT+ 1mg/l 2,4D + 0,5mg/l Asparagine
<b>M3</b>	MT+1mg/l 2,4D + 0,5mg/l BAP
<b>M4</b>	MT+ 1mg/l 2,4D + 0,5mg/l ANA
<b>M5</b>	MT+ 1mg/l 2,4D + 0,5mg/l kinétine

MT : Murashige et Tucker

**Mise en culture :** Sous la hotte à flux laminaire, les embryons excisés ont été placés dans les boites de pétri à raison de quatre explants par boîte. Les boîtes de Pétri ont été mises dans une chambre de culture obscure avec une température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , et une hygrométrie de 70

% (humidité relative). Pour chaque combinaison hormonale (génotype/milieu) six répétitions ont été réalisées. Le taux d'induction des cals et l'intensité de prolifération des cals ont été évalués après quatre semaines de culture.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Effet de la composition du milieu de culture :

L'initiation des cals à partir des embryons excisés de différentes variétés de mandarinier a été favorisée par la présence d'hormones de croissance dans le milieu. Tandis que le milieu de culture dépourvu d'hormones (M0) se solde par une absence totale d'activité cellulaire. Le taux de callogenèse a varié de 24% à 72% selon les cinq milieux de culture. Le milieu M3 contenant le 2.4D et la BAP à des concentrations de 1 et 0,5mg/l nous a permis d'obtenir un taux de callogenèse de 72,92%, ainsi le milieu M1 additionné par la Glutamine (0.5mg/L) a permis une induction de cal de 46.25%. Alors que ; le milieu M5 contenant la kinétine (0.5mg/L) a donné un taux de callogenèse relativement faible (24.72%). L'analyse de la variance a montré que l'effet de milieu de culture est hautement significatif (Tableau 3). La comparaison des moyennes des pourcentages d'induction des cals a révélé quatre groupes qui diffèrent significativement :

**Groupe 1 :** contient le milieu M3 dont le pourcentage d'induction de cals est 72.92%

**Groupe 2 :** contient le milieu M1 qui a permis un pourcentage de callogenèse de 46.25%

**Groupe 3 :** contient le milieu M2 et M4 ont permis respectivement des pourcentages d'induction de cals de 32.61% et 35.22%.

**Groupe 4 :** contient le milieu M5 dont le pourcentage d'induction de cals est 24.72%.

L'association de 2.4D et la glutamine M1 a favorisé un taux de callogenèse de 46.25%, Il a été rapporté que l'addition de glutamine au milieu contenant les cytokinines ou auxines a augmenté la capacité de régénération de cals de blé âgés de 6 à 10% et une fréquence d'induction de pousses de 55% (Shrivastava, 2001). Aussi ; Drira et Benbadis (1975) ont confirmé que l'addition de la glutamine est nécessaire pour la production de cals à partir de la mise en culture des anthères de *Citrus limon*. Dans des études antérieures, il a été constaté que l'application exogène d'un acide aminé spécifique, notamment l'asparagine, favorise le processus de l'embryogenèse somatique et la régénération. L'utilité de l'asparagine peut être considéré à fournir un approvisionnement en azote organique associée à la culture et de l'embryogenèse *in vitro*. Cependant différentes sources d'azote organiques, y compris les acides aminés indiquent la nécessité d'acides aminés pour des événements spécifiques au cours de la morphogenèse (SARKER et al, 2007). Ceci confirme les résultats obtenus du milieu M2 contenant de l'asparagine et qui a engendré 67.38% de cal ayant présentés une organogénèse. En revanche, les milieux M4 et M5 contenant respectivement l'asparagine, l'ANA et la kinétine ont donné le meilleur taux d'organogénèse de 64.77% et de 75.27% respectivement. Une diminution de la fréquence d'induction de cals a été constatée avec l'apport 2.4D et ANA, Ceci a été conforme aux études antérieures (Pena et al. 1995; Kaneyoshi et al. 1994;

Chakraborty et Goswami, 1999; Normah et al. 1997; Usman et al. 2005; Rani et al. 2004). Par ailleurs, la kinetine a favorisé l'induction des cals mais à partir de la mise en culture *in vitro* des ovules du mandarinier (Handaji et al., 2005, Singh et al 2006). La nature, l'âge,

la position, l'orientation des explants, leurs besoins spécifiques en éléments nutritifs et leurs teneurs endogènes en hormones influencent la réponse à la callogenèse (Mathews, 1987).

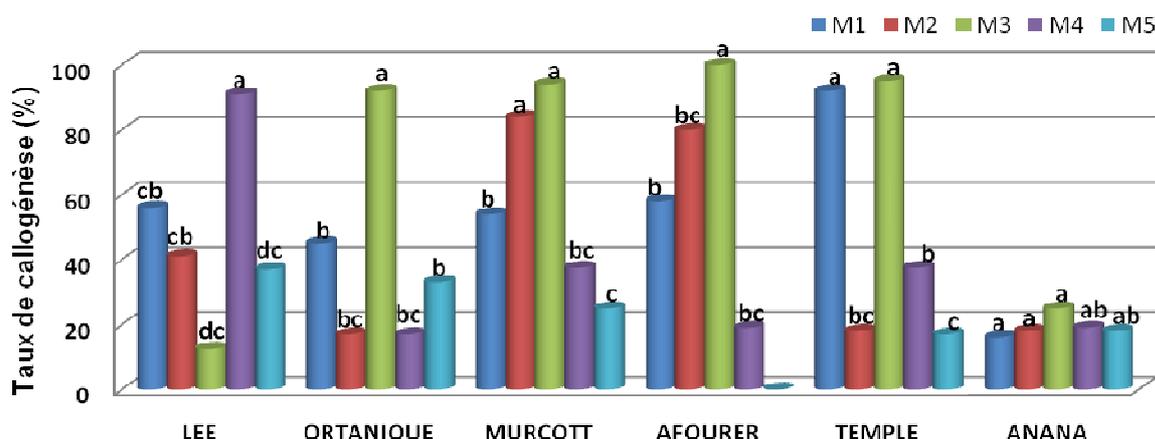
**Tableau 3 :** Pourcentage de callogenèse selon les milieux de culture utilisés

Variétés	Pourcentage de callogenèse					
	Milieux					
	M0	M1	M2	M3	M4	M5
Nadorcott	0a	41.67b	18.75c	100a	18.75b	-----
Anana	0a	32.14b	24.62bc	25.00a	18.75b	11.25b
Lee	0a	50.00b	42.50b	12.5b	91.67a	37.50a
Murcott	0a	53.33b	83.75a	95.00a	35.50b	25.00ab
Ortanique	0a	35.00b	16.68c	91.66a	16.67b	33.33ab
Temple	0a	91.67a	17.86c	95.00a	37.50b	16.67ab
Moyenne	0a	46.25	32.61	72.91	35.22	24.72

Les chiffres de la même colonne suivis des même lettres ne diffèrent pas significativement au seuil 5%(Test Duncan)

**Effet Variété :** D'après les résultats, on constate que l'aptitude à la callogenèse diffère non seulement en fonction des milieux de culture utilisés mais aussi selon les variétés utilisées. En effet, la variété Nadorcott (Afourer) est caractérisée par un taux de callogenèse très élevé (100%), suivi par la variété Temple et Murcott (95%), et Ortanique (93,66%) dans le milieu M3. Par contre, les mandarines Lee et Anana ont présenté des taux de callogenèse faibles de 12.5% et 25% respectivement (Figure 1). En revanche, elles ont donné le taux d'organogénèse le plus élevé. Par ailleurs, le milieu M4 a favorisé un taux d'organogénèse de 83% chez la variété Ortanique. Il est important de signaler

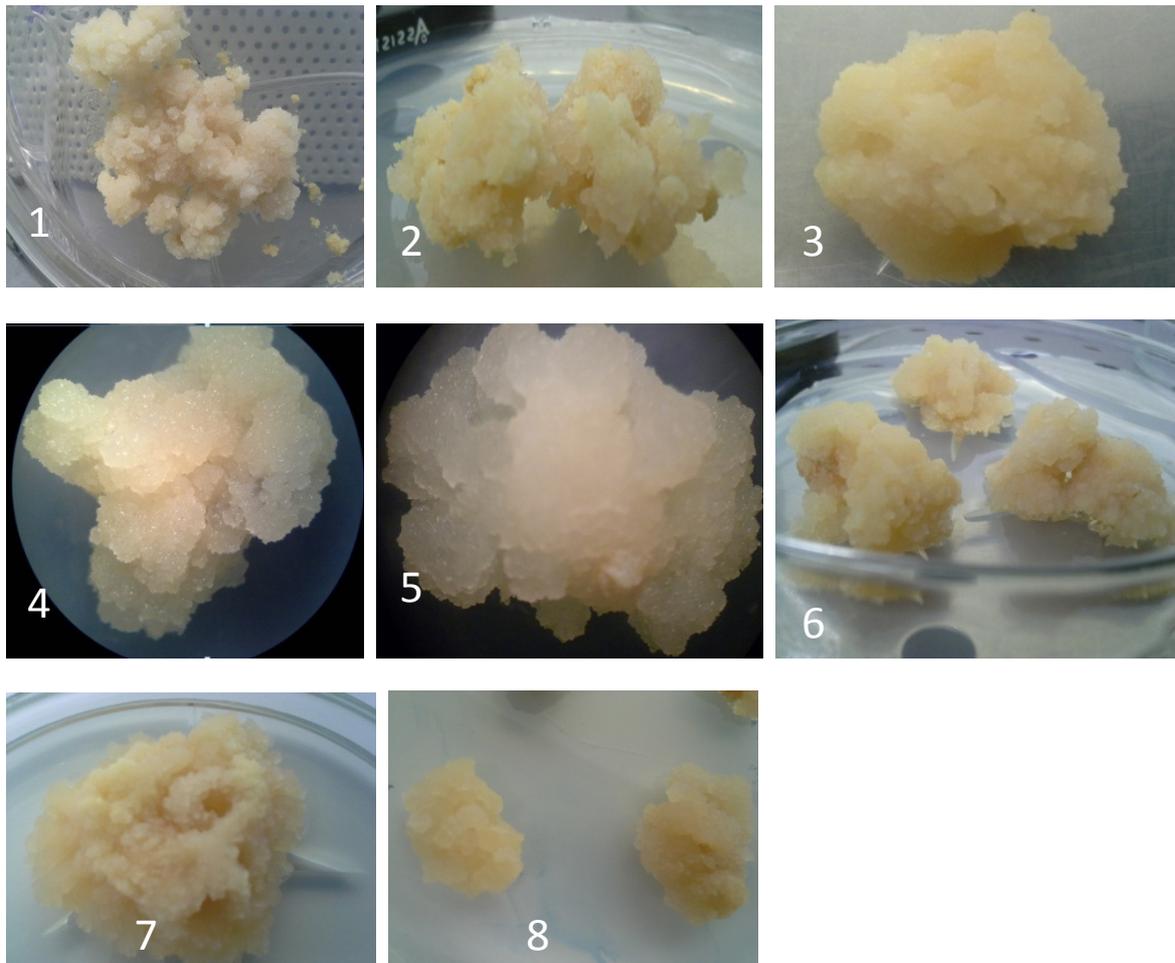
l'existence d'un effet hautement significative du facteur « variété » sur le pourcentage d'induction de la callogenèse. Le milieu M3 a favorisé l'optimisation de l'induction de callogenèse chez toutes les variétés de mandarinier à l'exception des deux variétés Anana et Lee. Cette différence de réactivité entre cultivars a aussi été constatée par de nombreux auteurs (Kochba et al. 1972 ; Gmitter et Moore, 1986 et Bugam et al. 2003, Handaji et al., 2005). Elle est souvent corrélée au niveau de la polyembryonie *in vivo* des cultivars et pourrait s'expliquer par des balances hormonales endogènes différentes (Gmitter et Moore, 1986)



**Figure 1 :** Taux de callogenèse selon les variétés de mandariniers et les milieux utilisés. (Les variétés suivis de la même lettres ne diffèrent pas significativement au seuil 5% (Test Duncan).

**Effet des combinaisons hormonales sur la morphologie des cals :** Selon les milieux et les variétés utilisées, les cals issus de graines excisées diffèrent par la couleur et la texture (Figure 2). Ainsi, l'aspect des cals change en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation (Tableau. 4). Le milieu M3 contenant le 2.4 D et la BAP a donné des cals blanchâtres, friables et embryogènes pour toutes les variétés étudiées à l'exception des variétés Lee et Anana qui ont donné des

cals Brunâtres et compacts. Le milieu M5 (2.4D+ kinétine) a donné des cals brunâtres et compacts chez toutes les variétés de mandarinier, tandis que le milieu M1 a donné des cals friables et blanchâtres chez les variétés Nadorcott et Temple. Par contre, les milieux de culture contenant ANA, la kinétine et l'Asparagine ont favorisé le déclenchement de la germination et l'apparition de la racine chez les différentes variétés (Figure 3).



**Figure 2 :** Cals obtenus à partir des embryons excisés dans le milieu M3 de différentes variétés de mandariniers : 1,2: Nadorcott, 3,4 : Murcott 5,6 : Temple , 7,8 : Ortanique

Les auxines, cytokinines et acides aminés ont présenté des effets différents en terme de pourcentage d'induction de callogenèse, d'organogénèse et de texture de cal, selon les différentes variétés de mandariniers. L'association des auxines et des cytokinines présentent un effet synergique et complémentaire, les cytokinines

stimulent la sensibilité des tissus en particuliers les cellules compétentes pendant la phase de callogenèse (Ramdan et al 2014), cet effet a été aussi démontré chez des espèces ligneuses telles que les pistaches (Hafdi et al, 2000), et le palmier dattier (Asemota et al, 2007). Huang et al, (2002), Savita et al, (2010).

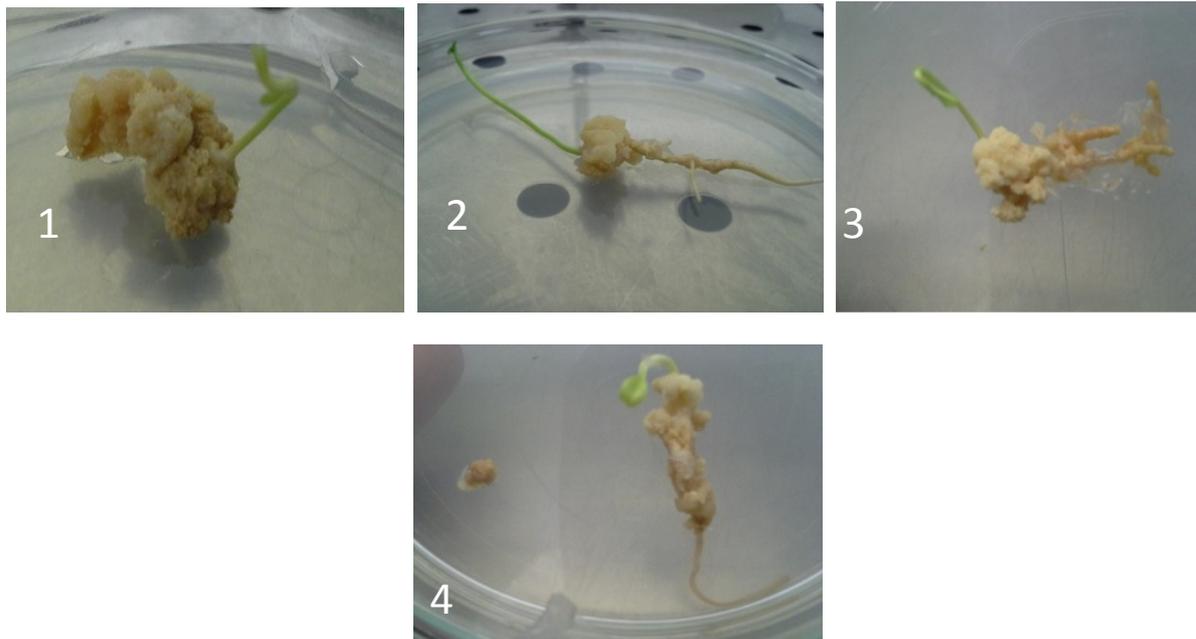
**Tableau 4 :** Couleur et texture des cals selon les variétés de mandariniers étudiés

Variétés/ Milieu	Lee	Anana	Ortanique	Nadorcott	Temple	Murcott
M1	Blanchâtre Compact	Brunâtre Compact	Blanchâtre Compact	Blanchâtre	Blanchâtre	Brunâtre
				Friable	Friable	Compact
M2	Blanchâtre Compact	Brunâtre Compact	Brunâtre Compact	Brunâtre Compact	Blanchâtre Compact	Brunâtre Friable
M3	Brunâtre Compact	Brunâtre Compact	Blanchâtre Friable	Blanchâtre Friable	Blanchâtre Friable	Blanchâtre Friable
M4	Blanchâtre Friable	Brunâtre Compact	Pas de résultats	Brunâtre Compact	Brunâtre Compact	Brunâtre Compact
M5	Brunâtre Compact	Brunâtre Compact	Brunâtre Compact		Brunâtre Compact	Brunâtre Compact

Le milieu M0 n'a donné aucune réaction

Ont rapporté aussi l'effet des auxines sur l'induction des cals chez les agrumes. De nombreux rapports indiquent que la source d'azote organique comme les acides aminés au lieu de la source inorganique comme les

nitrate ou les sulfate d'ammonium, peut améliorer la prolifération cellulaire et la régénération des génotypes spécifiques (Vasudevan et al, 2004; Asad et al, 2009.).



**Figure 3 :** Organogénèse des embryons excisés dans le milieu M2 de différentes variétés de mandariniers (1:Nadorcott, 2 : Murcott, 3:Temple, 4 : Lee)

### CONCLUSION

La variabilité de la callogenèse vis-à-vis des explants dépend du type et de la concentration des hormones de croissance utilisées et aussi du génotype de la variété. Ces résultats mettent en évidence la grande aptitude de

la callogenèse dans le milieu MT contenant 1 mg/l 2-4 D + 1 mg/l BAP. En effet, l'utilisation de la cytokinine combinés avec l'auxine semble être importante pour l'induction et la prolifération des cals. Les cals friables

obtenues seront repiqués dans d'autres milieux favorables pour l'induction d'embryogénèse somatique et puis la régénération des plantules. . Par ailleurs, la mandarine Nadorcott, en plus de son intérêt commercial,

s'est révélée très intéressante pour la grande capacité de produire des cals friables. La maîtrise de callogenèse pourrait servir le programme de fusion de protoplastes.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abousalim A, Nour-Eddine E, Othmane R et Abdelatif, 2002. Sélection *in vitro* de lignées de cals de porte-greffes d'agrumes tolérant la salinité. Actes Inst. Agron. (Maroc), vol 22 (4):189-191.
- Ahmed J, Nedra E, Claire K, Jacques D, 2002. Morphological and hormonal characterization of strawberry *in vitro* plants raised through axillary or stipular adventitious shooting. Plant Growth Regul 38, 273–278.
- Amzad H, Kunihiko K, Mineo M, Kazuhiro N, 2003. Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annum L.*). Euphytica 130, 233–239.
- Asemota O, Eke CR. and Odewale JO, 2007. Date palm (*Phoenix dactylifera L.*) *in vitro* morphogenesis in response to growth regulators, sucrose and nitrogen. Afr. J. Biotechnol., 6: 2353-2357.
- Asad S, Muhammad A, mansoor S, Zafar Y, 2009. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Saccharum officinalis L.*). Afr. J. Biotechnol. 8(7):1214-1218.
- Beloualy N & Bouharmont J, 1992. NaCl tolerant plants of *Poncirus trifoliata* regenerated from tolerant cell lines. Theor appl Genet 83: 509-514.
- Beloualy N, 1991. Plant regeneration from callus of three *Citrus* rootstocks. Plant Cell Tissue Org Cult 24: 29–34.
- Benyahia H, Chetto O, Dominique D, Yann F, 2012. Mise au point des conditions de callogenèse, caulogénèse et rhizogénèse chez les porte-greffes d'agrumes à partir d'épicotyle: cas du citrange Troyer. Journal of Applied Biosciences 60: 4375–4387.
- Bipasha C, Goswami B.C, 1999. Plantlet regeneration from long-term callus cultures of *Citrus acida* and the uniformity of regenerated plants. Scientia Horticulturæ 82, 159-169.
- Bougarfaoui M, 1987. Variabilité induite et amélioration de la tolérance à la salinité chez les agrumes. Mémoire, Option Horticulture, I.A.V. Hassan II, Rabat.
- Bouharmont J, 1996. Variation et sélection *in vitro*, tolérance à la salinité, *in vitro* variation, potentialités nouvelles et sélection *in vitro*. Biotechnologies Végétales 96: 74-79.
- Bugam F, Amin MN, Islam S, Azard MAK. and Rehman MM, 2003. *in vitro* plant regeneration from cotyledon derived callus of three varieties Pummelo (*C. grandis*). Online Journal of biological Science 3 (8) :155-759.
- Beniken L, Omari F, Dahan R, Van Damme P, Benkirane R, Benyahia H, 2013. Évaluation de l'effet du stress hydrique et du porte greffe sur la clémentine *Citrus reticulata Swingle var. Sidi Aissa*. Journal of Applied Biosciences 71:5692–5704.
- Carimi F, Tortorici MC, Crescimanno FG. and Guilio F, 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 FF, De Pasquale F. and Crescimanno FG, 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of citrus. Plant cell reports 18:935-940.
- Chakraborty B, Goswami BC, 1999. Plantlet regeneration from longterm callus cultures of *Citrus acida* Roxb. and the uniformity of regenerated plants. Sci Hortic 82: 159–169.
- Chakravarty B, Goswami BC, 1999. Plantlet regeneration from long-term callus cultures of *Citrus acida* Roxb. and uniformity of regenerated plants. - Scientia Hortic. 82(1-2): 159-169.
- Chaturvedi HC. and Mitra GC, 1915. A shift in morphologic pattern in citrus callus tissue during prolonged culture. Ann Bot 39: 683-687.
- Chatterjee B, Gupta PD, 1998. Induction of somaclonal variation by tissue culture and cytogenetic analysis in *Oryza sativa L.* Biol. Plant 40 (1), 25–32.
- Das A, Paul AK, Chaudhary S, 2000. Micropropagation of sweet orange (*Citrus sinensis osbeck*) for the development of nucellar seedlings. Ind J Exp Biol 38: 269–272.

- Drira N. and Benbadis A, 1975. Analyse, par culture d'antheres *in vitro*, des potentialites androgenetiques de deux espèces de Citrus (Citrus medica L. et Citrus).
- Duran-Vila N, Ortega V, Navarro L, 1989. Morphogenesis and tissue culture of three Citrus species. Plant Cell, Tissue Organ Cult 16(2), 123-13.
- Dutt M, Grosser JW, 2009. Evaluation of parameters affecting Agrobacterium mediated transformation of Citrus. Plant Cell Tissue Organ Cult 98, 331–340.
- Einset WJ, Cheng A, Elhag H, 1980. Citrus tissue culture: regulation of styler abscission in excised pistils. Can J Bot 58:1257–1261.
- El yacoubi H, Zidane L, Douira A, Rochdi Atmane, 2010. Effets de deux phytohormones et de l'hydrolisat de caséine sur la callogenèse de trois porte-greffes d'agrumes. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 2010, 149, 7-16.
- Gill MIS, 1992. Studies on somatic cell and protoplast culture in mandarin. PhD thesis. Punjab Agricultural university Ludhiana.
- Gill MIS, Singh, Z, Dhillon BS and Gosal SS, 1994. Somatic embryogenesis and Plantlet regeneration on callus derived from seedling explants of kinnow mandarin. Journal Hort Science 69: 231-236.
- Gmitter FG. et Moore GA, 1986. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryonic callus of Citrus: Embryon production, germination and plant survival. Plant. Cell. Tissue and Organ Culture. 6: 139-147.
- Gmitter FGJ, Ling XB, Deng XX ,1990. Induction of triploid Citrus plants from endosperm calli *in vitro*. Theor Appl Genet 80:785–790..
- Grosser JW, Gmitter Jr FG, 2009. *In vitro* breeding provides new and unique
- Hafdi A, Abousalim A, 2000, Effets de BAP combinéau 2,4-D et du prétraitement des explants avec BAP et 2,4-D sur l'induction et le développement des cals de Pistachier. ActesInst Agron Vet (Maroc), 20 (3), 163-167.
- Handaji N, Arsalane N, Lamarti A, Dambier D, Benyahia H, Miaghizo H, Cheikh OY, Ollitrault P, 2005. Induction de l'embryogenèse somatique et régénération des plantules chez les mandariniers (Citrus reticulata L). El Awamia; 114: 2 (2): 109-118.
- Huang T, Peng S, Dong G, Zhang L LiG, 2002, Plant regeneration from leaf-derived callus in Citrus grandis: Effects of auxins in callus induction medium – Plant cell, Tissue and organ culture, vol. 69, n°2, pp. 141-146.
- Kaneyoshi J, Kobayashi S, Nakamura Y, Shigemoto N, Doi Y, 1994. A simple and efficient gene transfer system to trifoliolate orange (Poncirus trifoliata Raf.). Plant Cell Rep 13:541–545.
- Kaushal K, Nath AK, Kaundal P, Sharma DR, 2004. Studies on somaclonal variation in strawberry (Fragaria \_ ananassa duch.) cultivars. Acta Hort. 662: 269–275.
- Khayri JM, Albahray M, 2001 *in vitro* micro propagation of citrus aurantifolia. Current Science, 81: 124-1246.
- Kobayashi S, Ohgawara T, Ohgawara E, Oiyama I, Ishii S, 1988. A Somatic Hybrid Plant Obtained By Protoplast Fusion Between Navel Orange (C. Sinensis) and Satsuma mandarin. Plant Cell Tissus. Org. Cult 14: 63-69.
- Kochba J, Spiegel Roy P, Safreu H, 1972. Adventives Plant From Ovules And Nucelli. In Citrus' Planta Berl 106: 237-245.
- Kochba J, Spiegel-Roy Y P, 1976. The Use Of Citrus Tissue Culture For Mutation Breeding: Effects Of Plant Growth Substances And Gamma Irradiation On Embryogenesis. In Improvement Of Vegetatively Propagated Plant And Tree Crops Through Induced Mutation. Wageningen. laea. Vienna. 83-92.
- Kochba J, Spiegel Roy P and Safreu H, 1972. Adventive plant from ovules and nucelli in citrus. Planta berl 106, 237-245.
- Lutz A, 1985. L'expression de la variabilité morphologique après régénération dans les cultures de tissus et de cellules, Bulletin Scientifique Botanique 132, France, pp.35-50.
- Manjula SM, Kuruvinashetti MS, Chandrashekhar CH, 2000. Regeneration, establishment and evaluation of somaclones in Sorghum bicolor (L.) Moench. Euphytica 115, 173–180.
- Mathews H, 1987. Morphogenetic responses from *in vitro* cultured seedling explants of mung bean (Vigna radiata L. Wilczek), Plant Cell, Tissue Org. Cult (11) 233-240.
- Moore GA ,1985. Factors Affecting *In Vitro* Embryogenesis from Undeveloped Ovules of

- Mature Citrus Fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci 110 (1): 66-70.
- Moore, 1985. Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature Citrus fruit. J. Amer. Soc. Hort.; Sci 110(1), 66-70.
- Munazir M, Qureshi R, Ali GM, Rashid U, Noor S, Mehmood K, Ali S, Arshad M ,2010. Primary callus induction, somatic embryogenesis and regeneration studies in elite wheat varieties from Pakistan. Pak. J. Bot 42(6): 3957-3965.
- Murashige T. and Tucker DPH, 1969. Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proceeding first international citrus symposium. Vol 3'
- Nafees A, Abdul rehmen K, LIAQAT A, INKISAR AB, 2009. *In vitro* culture of kinnow explants. Pak. J. Bot., 41(2): 597-602.
- Normah MN, Hamidoh S, Ghani FD ,1997. Micropropagation of Citrus halimii — an endangered species of South-east Asia. Plant Cell Tissue Org Cult 50:225–227.
- Nozeran R, 1985. «L'expression de la variabilité dans les cultures d'organes » Actualités Botaniques, Paris, pp.11-21.
- Ollitrault P, Luro F, Allent V et Dambier D,1995. Diversification des mandariniers: apport des biotechnologies pour la création de cultivars triploïdes aspermes. Symposium sur les mandarines. San Giuliano. France, 5-11.
- Ollitrault P, Ollitrault F, Cabasson C, 1992. Fruits, 47 (spéc. Agrumes) : n. spéc. Induction of embryogenetic citrus calli through ovule culture : isozyme detection of the origin of embryos.
- Pena L, Cervera M, Juarez J, Navarro A, Pina JA, Duran-Villa N, Navarro L, 1995. Agrobacterium-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep 14:616–619.
- Radhakrishnan R, and Ranjithakumari BD, 2007. Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr. Cv. CO3) via half seed explant culture, J of Agric Tech 3(2) 287-297.
- Raman H, Gosal SS, Brar DS, 1992. Plant regeneration from callus cultures of Citrus limon and C. jambhiri. - Crop. Impr 19(2), 100-103.
- Rani G, Singh B, Sharma S, Rehan L, Zaidi AA, Nagpal A, Virk GS , 2004. Micropropagation of Kinnow (*Citrus nobilis* x *Citrus deliciosa*) through nodal segments. JInd Bot Soc 83:26–29.
- Ramdan R, Handaji N, Beyahia H. and Ibriz M, 2014. Influence of growth regulators on callus induction from embryos of five citrus rootstocks . Journal of Applied Biosciences 73: 5959– 5965.
- Sabharwal PS, 1963. *in vitro* culture of ovule, nucelli and embro of citrus reticulata var 'NagpuriS wingle.Plantt issue and organ culture. International society of plant morphology. Pp:255-274.
- Shrivastava S, Chawla HS, 2001. Synergistic effect of growth regulators and glutamine on regeneration response in high yielding cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). Ind. J. of Gene and Plant Breed 61:12.
- Singh B, Sharma S, Rani G, Zaidi AA, Virk GS, Nagpal A ,2006. *In vitro* flowering in embryogenic cultures of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora). Afr J Biotechnol 5:1470–1474.
- Sarker KK, Kabir AH, Sharmin SA, Nasrin Z, Alam MF, 2007. Improved somatic embryogenesis using L-Asparaginein wheat (*Triticum aestivum* L.).original scientific papers 631.547.1.(045)=862.
- Starrantino A, Licretti S, Russo G, Raciti M, Recupero RG , 1992.Embryogenus callus formation, protoplast regeneration and somatic fusion of different Citrus species. VII International Citrus Congress.
- Savita, Vijay, Virk GS. and Avinash N, 2010. Effect of Explant Type and Different Plant Growth Regulators on Callus Induction and Plantlet Regeneration in Citrus jambhiri Lush - Environ. We Int. J. Sci. Tech., 5, 97-106.
- Tang H, Ren Z. and Krczal G, 2000. Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryo cotyledons of three sour cherry cultivars (*Prunus cerasus* L.). Sci Hortic (Amsterdam), 83: 109-126.
- Tao H, Shaolin P, Gaofeng D, Lanying Z, Gengguang L, 2002. Plant regeneration from leaf-derived callus in Citrus grandis (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. Plant Cell Tissue Org Cult 69:141–146.
- Tao H, Shaolin P, Gaofeng D, Lanying Z, Gengguang L, 2002. Plant regeneration from leaf-derived callus in Citrus grandis (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. Plant Cell Tissue Org Cult 69:141–146.

- Usman M, Muhammad S, Fatima B, 2005. *In vitro* multiple shoot induction from nodal explants of Citrus cultivars. J Cent Europ Agric 6:435–442.
- Vardi A et Spiegel-Roy P, 1982. Plant Regeneration From Citrus Protoplasts: Variability In Methodological Requirements Among Cultivars And Species. Theor. Appl. Genet. 62: 171-176.
- Vardi A, Bleichman S et Aviv D, 1990. Genetic Transformation of Citrus Protoplasts and Regeneration of Transgenic Plants .
- Vasudevan A, Selveraj N, Ganapathi A, Kasthuriengan, Anbazhagan RV, Manickavasagam M (2004). Glutamine: a suitable nitrogen source for enhanced shoot multiplication in *Cucumis sativus* L. Biol. Plant 48(1):125-128.