

## Induction de cals friables embryogènes chez cinq géotypes d'agrumes

### [ Friable embryogenic callus induction in five citrus genotypes ]

Ouiam Chetto<sup>1-3</sup>, Dominique Dambier<sup>2</sup>, Anas Fadli<sup>1-3</sup>, Majda Sttitou<sup>1-3</sup>, Rachid Benkirane<sup>3</sup>, and Hamid Benyahia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut National de Recherche Agronomique, BP. 257, Kenitra, Maroc

<sup>2</sup>CIRAD, UMR AGAP, F-34398 Montpellier, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Biodiversité et Ressources Naturelles, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, Kenitra, Maroc

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** The objective of this study is the production of friable embryogenic callus in citrus to having the necessary material for protoplast isolation to be integrated into rootstock improvement program using the asexual pathway. Ovules, embryos and styles explants of Citrus five genotypes: *Poncirus trifoliata*, *Citrus reshni Hort. ex Tan*, *Citrus amblicarpa*, *Citrus volkameriana* and *Citrus paradisi Macf.*, are cultured in MT medium supplemented with 4% sucrose, 0.05% of malt extract and 1% agar was used as basal medium. Hormones (kinetin (Kn), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzylaminopurine (BAP) were added to this medium at different concentrations. The rate of callus of different explants was evaluated by determining the percentage of callus induction by explant. The conducted experiments show a significant effect of genotype, explant type and hormone combination chosen. Friable callus forms were on the 3 explants with variable frequencies. Embryo explants show is most favorable to the production of friable callus; the best callogenesis is obtained with the culture media containing auxin and cytokinin combined M2 (1mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BAP) and M3 (1mg/l 2,4-D + 0.5mg/l Kn), by against the style explants and ovule have induced embryogenic calli respectively on the M4 (0.5 mg/l BAP) and M5 (1mg/l Kn) medium.

**KEYWORDS:** Citrus, Friable callus, Hormones, Ovules, Styles and Embryos.

**RESUME:** L'objectif de cette étude est la production de cals friables embryogènes de différents géotypes d'agrumes afin de disposer d'un matériel de base destiné à être intégré dans un programme d'amélioration de porte-greffes par voie asexuée. Des explants d'ovules, d'embryons et de styles de cinq géotypes d'agrumes : *Poncirus trifoliata*, *Citrus reshni Hort. ex Tan*, *Citrus amblicarpa*, *Citrus volkameriana*, et *Citrus paradisi Macf.*, ont été mis en culture sur le milieu MT additionné de 4 % de saccharose, de 0,05 % d'extrait de malt et de 1 % d'agar, a été utilisé comme milieu de base. Les hormones (kinétine (Kn), acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et 6-benzylaminopurine (BAP) ont été ajoutées à ce milieu à différentes concentrations. Le taux de callogenèse de différents explants est évalué par la détermination du pourcentage d'induction des cals par explants. Les expérimentations mettent en évidence un effet marqué du géotype, du type d'explant et de la combinaison hormonale choisie. Des cals friables ont été produits sur les 3 explants avec des fréquences variables. Les explants d'embryon semblent plus favorables à la production des cals friables ; la meilleure callogenèse a été obtenue avec les milieux de culture additionnés d'auxine et de cytokinine combinés M2 (1mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BAP) et M3 (1mg/l 2,4-D + 0.5mg/l Kn). Par contre les explants de style et d'ovule ont induit des cals embryogènes respectivement sur le milieu M4 (0.5 mg/l BAP) et M5(1mg/l Kn).

**MOTS-CLEFS:** Agrume, Callogenèse, hormones, Ovules, Embryons, Styles.

## 1 INTRODUCTION

L'agrumiculture au Maroc est une source importante de revenus, d'emploi et de sécurité alimentaire et nutritionnelle. En dépit de sa production (2.2 MT) [1] et de son extension, elle souffre de nombreuses maladies et problèmes parasitaires engendrant des pertes avant et après récolte.

Au cours des siècles, l'amélioration des connaissances en génétique a permis à l'Homme de mieux diriger les croisements afin de combiner les caractères les plus favorables. Ceci a conduit pour de nombreuses espèces d'intérêt agronomique à une augmentation de certaines performances, mais aussi parfois à la perte de qualités. Les programmes d'amélioration ont largement exploité la fertilité des agrumes permettant d'améliorer les caractères agronomiques ou pomologiques de certains génotypes [2]. Néanmoins, la recombinaison génétique est limitée par la biologie de la reproduction et la forte hétérozygotie de la plupart des cultivars et porte-greffes [3].

L'amélioration génétique des espèces fruitières pérennes requiert souvent de nombreuses années par voie conventionnelle [4]. Pour surmonter les problèmes de sélection classique, les méthodes s'appuyant sur l'utilisation de la voie asexuée ont émergé et les biotechnologies constituent un des outils les plus importants dans la recherche agricole. Les cals embryogènes d'agrumes offrent de nombreuses perspectives pour la création variétale et la propagation des porte-greffes [5]. Ils constituent un matériel végétal unique et original pour des manipulations génétiques ; et un système cellulaire particulièrement approprié pour l'application des techniques nouvelles, telles que la fusion somatique, la transformation génétique ou l'exploitation de la variation somaclonale pour l'amélioration des porte-greffes [6], [7]. D'autres approches comme la mutagenèse ou l'évaluation *in vitro* des génotypes vis-à-vis des agents pathogènes sont aussi des outils indispensables pour mieux maîtriser la résistance chez les espèces d'agrumes [8], [9].

La mise en place d'un protocole d'induction de cal friable est une condition préalable essentielle pour exploiter l'amélioration en contournant la voie sexuée.

L'initiation de la callogenèse dépend de nombreux facteurs : nature et concentration d'hormones ajoutées au milieu de culture, génotype et types d'explants. La présente étude porte sur l'effet de ces facteurs sur l'induction de cals friables chez 5 génotypes d'agrumes.

## 2 MATERIEL ET METHODES

### 2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL UTILISÉ ET MÉTHODE DE DÉSINFECTION

Le matériel végétal utilisé a été collecté sur des arbres cultivés en plein champ appartenant à la collection de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Kenitra. Cinq génotypes d'agrumes ont été sélectionnés dans le cadre de cette étude : *Citrus reshni Hort. ex Tan* (Mandarine Cléopâtre), *Citrus amblicarpa* (Mandarine Nasranan), *Citrus volkameriana*, *Poncirus trifoliata*, et *Citrus paradisi Macf.* (Pomelo Marsh).

Des ovules non développés prélevés sur de petits fruits âgés de cinq semaines après anthèse [5], et des graines de fruits matures ont été stérilisées en surface par immersion pendant 10 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10 %, suivie de trois rinçages de 10 min dans de l'eau distillée stérile. Les fleurs recueillies avant l'ouverture, au cours de la période de pleine floraison ont été désinfectées par immersion pendant 30 s dans 70 % d'éthanol, 15 min à 0.3 % (p/v) d'hypochlorite de sodium, suivi de trois rinçages de 5 min dans de l'eau distillée stérile.

Fragments de styles, ovules et embryons ont été excisés à l'aide de pinces et de scalpels stériles et placés dans des boîtes de Pétri contenant les différents milieux.

### 2.2 MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

Le milieu de base utilisé était le milieu MT [10], additionné de 40 g/l de saccharose, 0.5 g/l d'extrait de malt et de pH ajusté à 5,7. Six milieux différents par la nature et la concentration des régulateurs de croissance ont été préparés (Tab. 1). Ils ont été solidifiés par l'ajout d'agar [Type M Sigma A-4800] à raison de 1 % (p/v) ou de gelrite 0.2 % (p/v) dans le cas de la culture d'ovule. La stérilisation a été effectuée dans un autoclave à 121 ° C pendant 20 minutes.

Les boîtes sont scellées avec du film étirable après mise en culture des explants et placées dans une chambre de croissance obscure thermo-régulée, à  $26 \pm 1$  °C. Le taux de callogenèse des explants est évalué par le rapport du nombre d'explants ayant donné des cals avec le nombre total d'explants mis en culture. Pour chaque type d'explant, nous avons réalisé six lots de 10 boîtes de Pétri contenant chacune 4 explants et 20 pour la culture d'ovules.

**Tableau. 1 Composition hormonale des différents milieux (concentrations en mg.l<sup>-1</sup>)**

Hormone	Milieux de culture					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2.4-D)	-	1	1	-	-	1
6-Benzylaminopurine (BAP)	-	0.5	-	0.5	-	-
Kinétine (Kn)	-	-	0.5	-	1	-

### 2.3 CROISSANCE DES CALS

Deux cents mg de cals friables sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant les différents milieux utilisés pour l'induction des cals et incubés dans les conditions précédentes, Six répétitions par génotype sont réalisées. Le taux de croissance est déterminé par le rapport  $\left(\frac{[(MF_T - MF_0)]}{30}\right)$  des matières fraîches (MF<sub>T</sub>) à 30 jours et au temps T<sub>0</sub>.

### 2.4 ANALYSES STATISTIQUES

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA version 6.0 selon la procédure ANOVA. Lorsque la valeur de la probabilité P est inférieure à 5 %, l'analyse est complétée par une comparaison de moyennes à l'aide d'un test de Duncan (au seuil de 5 %).

## 3 RÉSULTATS

Les milieux testés avec les différentes balances hormonales ont induit la formation des cals à partir de trois types d'explants (embryon, ovule et style) des cinq génotypes. Dès la première semaine, une réactivité des explants vis-à-vis des milieux de culture est observée, le plus souvent sous forme de gonflement en lien avec les divisions cellulaires internes. Après 10 à 20 jours de contact, des néoformations apparaissent sur certains milieux de culture, sous forme de petits cals, mais aussi parfois un développement de racines et de tiges ou encore la formation d'embryons. Au bout d'un mois, les cals formés présentent des caractéristiques variables de couleur et de texture selon les explants utilisés.

L'analyse de variance a révélé un effet hautement significatif de trois facteurs : le génotype, le type d'explant, la combinaison hormonale mais également l'interaction de ces trois facteurs (Tab.2).

**Tableau 2. Analyse de variance de l'effet d'hormone sur la callogenèse à partir de trois explants prélevés de huit génotypes d'agrumes**

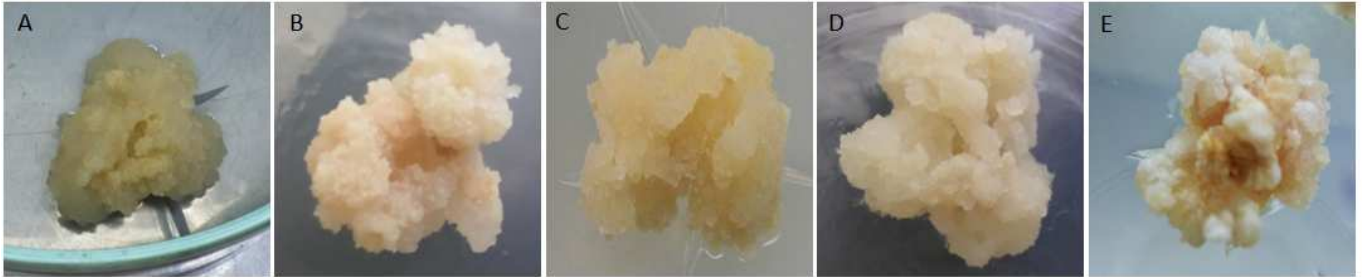
Source	Ddl	F	Pr > F
Milieu	5	51.9	<. 0001
Génotype	4	13.3	<. 0001
Explant	2	123.6	<. 0001
Génotype x Milieu	20	3.04	<. 0001
Génotype x Explant	8	20.2	<. 0001
Explant x Milieu	10	60.2	<. 0001
Génotypes x Milieu x Explants	40	2.98	<. 0001

### 3.1 DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DES CALS

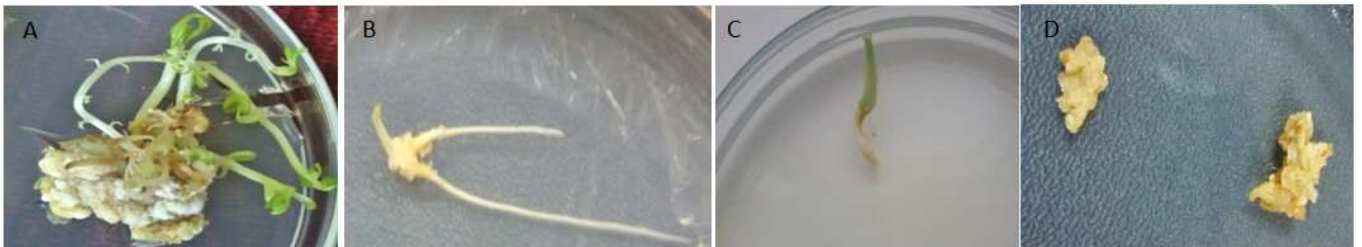
Les cals induits au cours de cette étude présentaient des aspects variables de couleur et texture selon les génotypes et le type d'explant. Les cals issus de culture d'embryons des 3 génotypes - *Poncirus trifoliata*, mandarine Nasnaran et Pomelo Marsh - étaient friables et de couleur jaunâtre tandis que ceux de mandarine Cléopâtre et du citron Volkamer ont produit des cals semi-compacts nodulaires (Fig. 1) de couleur beige parfois brunâtre.

La culture d'ovules sur les différents milieux, a abouti à la formation de cals compacts non-embryogènes avec des cellules densément agrégées, de forme circulaire, la couleur variant du blanc au jaune (Fig. 3). Une croissance importante était observée durant la première semaine après mise en culture puis stoppée pour une partie d'entre eux virant au jaune foncé, après transfert sur un nouveau milieu. En revanche, concernant les mandarines Nasnaran et Cléopâtre, on a observé des cals friables embryogènes de couleur jaunâtre présentant une texture granuleuse.

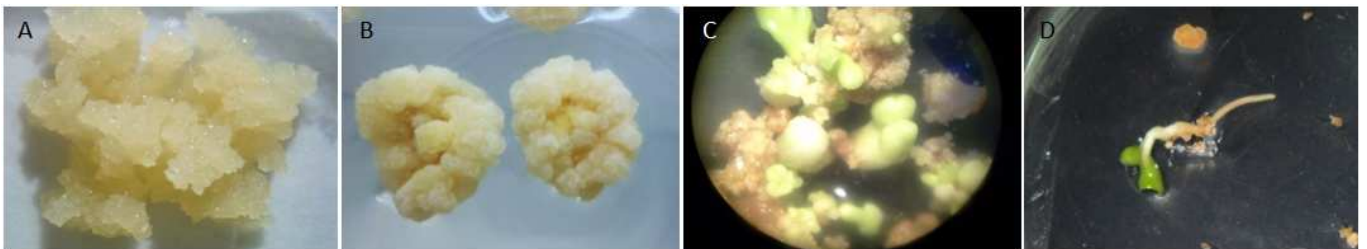
Par ailleurs, les cals obtenus à partir des explants de style étaient soit friables et embryogènes de couleur jaunâtre, pour la mandarine Nasranan (Fig. 4) et le citron Volkamer, soit de texture semi-compacte granuleuse de couleur jaunâtre parfois translucide pour la mandarine Cléopâtre et Pomelo. Seuls, de petites cals dégénérent rapidement étaient observés chez Poncirus.



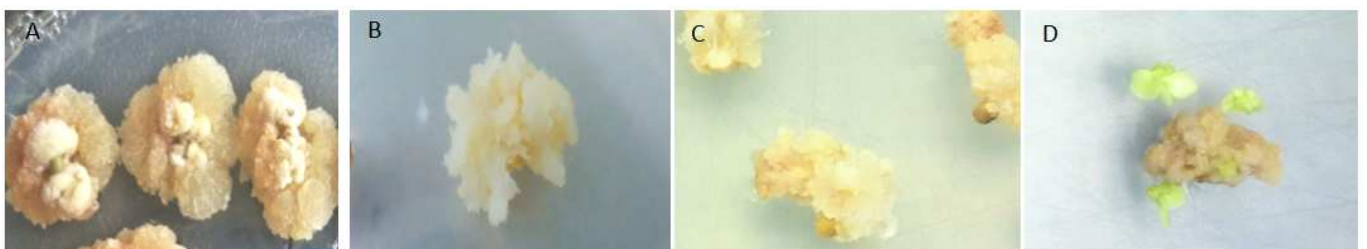
**Fig. 1. Aspect des cals issus de culture d'embryon. A : mandarine Nasranan. B : mandarine Cléopâtre. C : Poncirus trifoliata. D : Pomelo Marsh. E : citron Volkamer**



**Fig. 2. Réponse de différents types d'explants : embryon sur milieu contenant 2,4-D (M6). A : tige et feuilles formées sur un cal. B : formation des racines et la tige. C : germination directe d'un embryon nucellaire sur milieu contenant la kinétine seule (M4 et M5). D : cals produits sur le milieu M6**



**Fig. 3. Aspect des cals issus de culture d'ovules. A : cal friable de mandarine Cléopâtre. B : cals compacts : C : formation d'embryons sur cals friables. D : formation directe d'un embryon de citron Volkamer**



**Fig. 4. Aspect des cals issu de la culture de style. A : cal compact. B et C : cal friable de mandarine Nasranan et citron Volkamer. D : formation des embryons sur le cal de mandarine Nasranan**

3.2 EFFET DU MILIEU SUR LA CALLOGENÈSE

Les résultats de l'analyse de la variance ont révélé un effet hautement significativement de la variable « milieu » sur l'initiation de la callogénèse ( $p < 0.05$  par ANOVA, Tab. 2). Le taux d'induction des cals a fluctué de 0 à 100 % (Fig. 5,6 et 7), ce que révèle la grande influence des hormones sur la callogénèse. En effet, sur le milieu dépourvu d'hormones M1, aucun cal n'a été observé pour les explants d'embryons. L'absence d'hormone a provoqué la germination de ce dernier (Fig. 2). Ces résultats étaient semblables à celles du milieu M4 (0.5 mg/l BAP et M5 (1 mg/l Kn). Les milieux M2 et M3 regroupant l'auxine et la cytokininne permettent d'enregistrer des taux de callogénèse élevés. La culture des embryons sur un milieu M6 (1 mg/l 2,4-D) a permis la formation des cals, mais le taux de ces derniers était faible en comparaison avec les milieux M2 et M3, en plus de la formation des cals, des néoformations racinaires ou caulinaires ont été obtenues (Fig. 2), des fois, on assiste à un arrêt de la croissance des cals.

L'induction de la callogénèse à partir d'ovule a été obtenue avec toutes les combinaisons hormonales testées, mais avec une réactivité variable, qui dépend de génotype (Fig. 6). Ce sont les milieux contenant la cytokininne seule ou combinée avec 2,4-D qui donne le meilleur taux de callogénèse. Parallèlement, nous avons noté la formation des embryons directe ou indirecte sur les cals induits. Toutefois, la fréquence de callogénèse sur le milieu M6 était faible comparativement avec les autres milieux.

Quant aux explants de style (Fig.7), un maximum de callogénèse a été observé sur le milieu M4 et M5 et dans les milieux M2 et M3 chez certains génotypes. Les milieux M1 (sans hormone) et M6 ont montré une faible activité cellulaire durant la période de culture, certains explants ont brunis et se sont desséchés après quelques jours de la mise en culture.

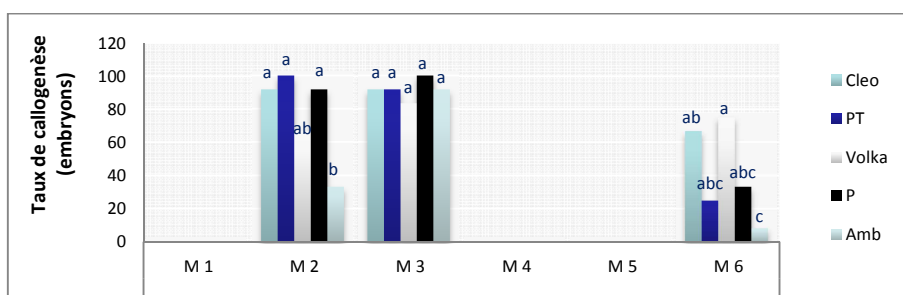


Fig. 5. Pourcentage de cals formés à partir de culture d'embryon de cinq génotypes sur milieu MT additionné de différentes hormones. Les milieux ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %

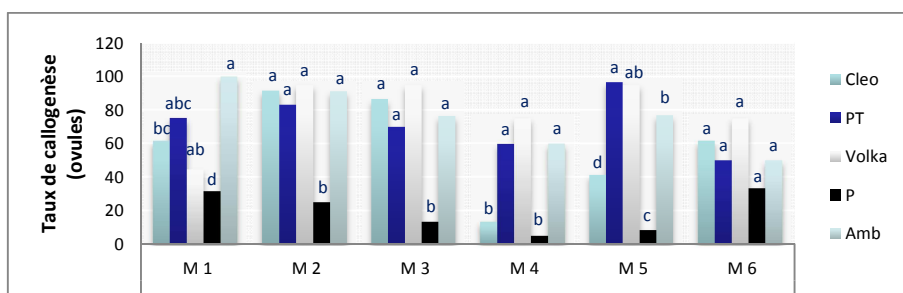


Fig.6. Pourcentage des cals formés à partir de culture d'ovules de cinq génotypes sur milieu MT additionné de différentes hormones. Les milieux ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %

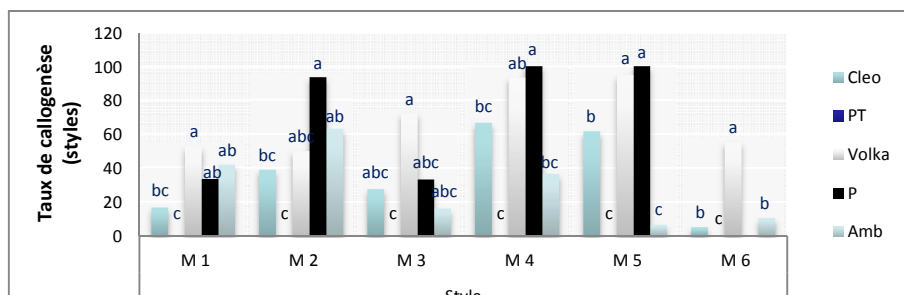


Fig. 7. Pourcentage des cals formés à partir de culture de styles de cinq génotypes sur milieu MT additionné de différentes hormones. Les milieux ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5%

### 3.3 EFFET DU GENOTYPE SUR L'INDUCTION DE LA CALLOGENÈSE

L'expérimentation menée parallèlement sur plusieurs génotypes a mis en évidence l'influence des facteurs génétiques sur l'aptitude callogène ( $p < 0.05$  par ANOVA, Tab. 2). La comparaison des moyennes par le test de Duncan a révélé que la différence entre les moyennes obtenues chez les huit génotypes mis en culture est significative. Nous avons constaté pour les différents milieux de culture que quel que soit l'explant utilisé, une plus forte capacité d'induction de cals était mise en évidence pour les 3 génotypes - citron *Volkamer*, mandarine Cléopâtre et mandarine Nasranan.

Comme indiqué sur la Fig. 6, une faible réponse était observée avec les explants d'ovule de Pomelo Marsh tandis qu'aucune réactivité n'apparaissait avec les explants de styles de *Poncirus trifoliata* (Fig.7).

### 3.4 EFFET DU TYPE D'EXPLANT SUR LA CALLOGENÈSE

Nos résultats ont mis en évidence l'influence du type d'explants sur l'apparition des cals des génotypes étudiés. Une interaction significative ( $P < 0,001$ ) a été notée entre le type d'explant et sa réactivité avec les milieux de culture contenant les hormones. La néoformation de cals pour l'ensemble des explants a commencé au bout de 5-8 jours de culture. Les cals issus de différents explants présentaient une variation morphologique importante. Généralement, les modalités de la callogénèse sont identiques chez ces explants et se traduisent par un gonflement primaire suivi d'une phase de multiplication de cals. L'étude comparative des moyennes de fréquences d'induction de cals montre que l'expression du potentiel callogène est élevée chez les ovules, quel que soit le milieu utilisé, supérieure à celle des styles. Les embryons mis en culture sur les milieux (M1, M4 et M5), ont induit chez tous les génotypes la germination directe des embryons.

### 3.5 EVALUATION DE LA CROISSANCES DES CALS SUR MILIEUX DE MULTIPLICATION

Un taux de callogénèse significativement plus élevé a été observé pour la culture d'ovule. Toutefois, compte-tenu de la texture des cals formés, il n'est pas apparu utile de les maintenir pour la multiplication. Seuls les cals friables ont été conservés. Une subculture des cals issus de culture d'embryons sur les mêmes milieux d'induction n'a révélé aucun changement d'aspect. Seule la croissance a été modifiée.

Une comparaison multiple des moyennes portant sur la matière fraîche des cals des 5 génotypes étudiés, a permis de mettre en évidence l'influence de la combinaison hormonale sur le taux de croissance. D'après les résultats de la figure 8, nous constatons que le taux de croissance des cals issus de culture d'embryons sur milieu M3 (1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l Kn) est nettement supérieur à celui obtenu pour le milieu M2 (1 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP) et M6 (1 mg/l 2,4-D)., Le taux de croissance le plus élevé a été enregistré pour Pomelo Marsh, suivi de *C. volkameriana*.

En ce qui concerne les cals issus de culture de style, leur croissance est apparue réduite comparativement à celle des cals issus de culture d'embryons. *C. volkameriana* présentait une meilleure croissance sur le milieu M4, et Pomelo Marsh, sur M5. Par contre, les cals de mandarine Cléopâtre ne semblaient pas se multiplier sur tous les milieux.



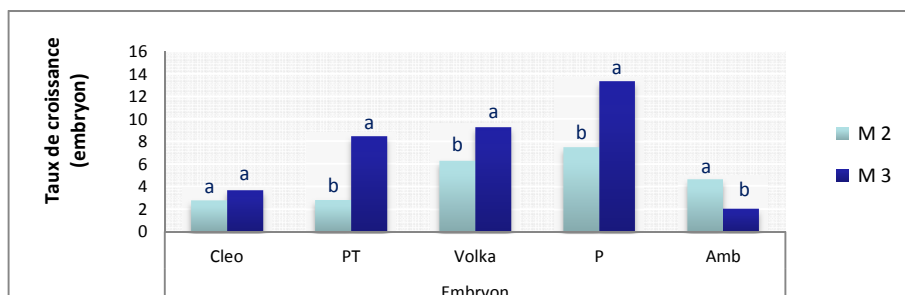


Fig. 8. Influence de la composition du milieu de culture sur le taux de croissance des cals issus de culture d'embryons. Les milieux ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %.

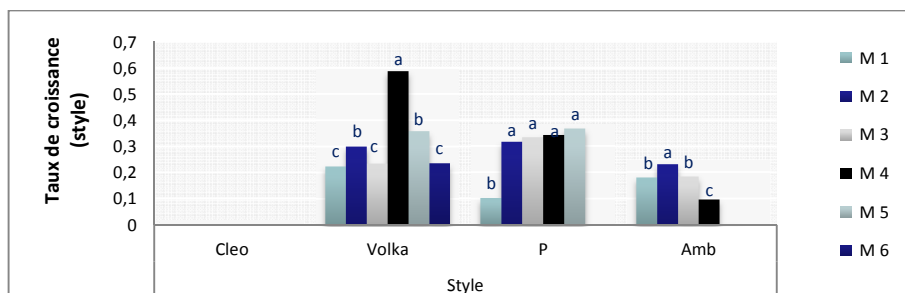


Fig. 9. Influence de la composition du milieu de culture sur le taux de croissance des cals issus de la culture d'embryon. Les milieux ayant la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5 %.

#### 4 DISCUSSIONS

Des embryons, des ovules et des styles des cinq génotypes ont été mis en culture sur le milieu MT additionné de différentes combinaisons d'hormone. Après quatre semaines, l'aptitude callogène semble être fortement dépendante de la combinaison hormonale, du type d'explant et du génotype. A la mise en culture des explants, sont associées généralement une dédifférenciation cellulaire et une reprise de l'activité mitotique - callogenèse, organogénèse ou embryogénèse -, suivant les processus physiologiques qui commandent le devenir de cet explant et par modulation de ces trois facteurs [11].

La composition du milieu de culture peut affecter différemment le pouvoir 'callogène' [12], [13]. Le milieu contenant du 2,4-D à 1 mg/l combiné à la BAP ou la Kn (0.5 mg/l) permet la formation des cals friables à partir de la culture d'embryons. Il apparaît nettement que l'association 'auxine-cytokinine' à un effet, sur la callogenèse, l'efficacité du 2,4-D en combinaison avec des cytokinines peut être dû à leur rôle dans la synthèse de l'ADN et la mitose [14]. ce rapport auxine/cytokinine dans le milieu de culture est connu pour jouer un rôle majeur dans la mise en place des cultures de cals chez plusieurs espèces d'agrumes [15], [16], [17], [18], et même chez d'autres espèces ligneuses [19], [20]. Par contre, et bien qu'il soit considéré comme une substance essentielle à la callogenèse, la BAP et la Kn ont stimulé la germination directe des embryons. L'utilisation séparée du 2,4-D dans le milieu s'est traduit par un faible taux de callogenèse; dans ces conditions, les cals obtenus ont montré une potentialité organogène. Des observations similaires [18], [21] ont également été enregistrée. En revanche, d'autres auteurs [22] et [23] ont enregistré chez le limettier Rough lemon et l'oranger doux (*Citrus sinensis*) un pourcentage de cals plus élevé en présence du 2,4-D seul.

Nos essais ont également montré que l'usage d'hormone n'est pas indispensable pour l'induction des cals à partir des explants d'ovule et de style, mais leur utilisation améliore nettement le taux de callogenèse. Les explants manifestent une réponse variable à la callogenèse et sur le plan morphogénétique (aspect, couleur, texture). Des facteurs endogènes comme le niveau des régulateurs de croissance au sein des explants ainsi que leur interaction avec les régulateurs exogènes peuvent influencer la réponse callogène [24], [25]. Les résultats reportés ici indiquent un effet globalement favorable des cytokinines sur la fréquence d'émergence des cals. En outre la kinétine favoriserait chez certains génotypes la production des cals friables embryogènes à partir de la culture d'ovule (Fig.5). De tels résultats avaient précédemment été mis en évidence par [5], [26]. On ce qui concerne les explants de style, l'utilisation d'une faible concentration de BAP semble être efficace dans la stimulation de la formation des embryons somatiques, comme déjà observée par la référence [27]. Les embryons somatiques se sont développés directement sur l'explant ou après passage par une structure cal.

Les différences des taux de callogenèse observées chez les cinq génotypes pour un même type d'explant ont indiqué que la constitution génétique est également un facteur important affectant l'efficacité d'induction des cals, cette différence de réactivité entre génotypes ayant été signalée par de nombreux auteurs [28], [29], [30]. La référence [31] a constaté des résultats différents sur l'induction de cals après culture d'ovules non fécondés de six cultivars d'orange douce. Toutefois, pour la majorité des génotypes étudiés, la callogenèse à partir de culture d'ovules conduit à la formation des cals compacts circulaires similaires à ceux décrits par la référence [5], seuls deux génotypes de Mandarinier Nasranan et Cléopâtre ont réussi à produire des cals friables. Les embryons ont donné en général des cals friables présentant des taux élevés de multiplication. En effet, l'étude comparative de l'influence du milieu de culture sur la croissance des cals des génotypes étudiés montre que le milieu M3 est plus efficace que le milieu M2 pour le maintien du statut de 'cal friable'. Permettant d'optimiser ce gain sur un cycle de 30 jours. Toutefois, les cals issus de culture de styles étaient en général semi-compacts, de croissance lente, contrairement aux résultats signalés par la référence [32].

## 5 CONCLUSION

Cette étude fait apparaître que l'induction de cals à partir de cultures d'embryons, d'ovules et de styles est conditionnée à la composition du milieu de culture et au type d'explant. Le pourcentage le plus élevé de cals friables à partir de la culture d'embryons, a été obtenu sur le milieu MT additionné de 1 mg/l de 2,4-D + 0,5 mg/l de BAP ou de Kn, l'incorporation de 1 mg/l de kinétine permis l'induction de cals friables sur culture d'ovules. Concernant la culture de styles, 1 à 2 semaines après mise en culture, sont apparus des cals translucides de couleur blanchâtres, semi-compacts évoluant après 6 mois en de petits cals friables.

## REFERENCES

- [1] Bilan de la campagne 2013/2014. Division de l'horticulture. Direction de la Production Végétale. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime.
- [2] Bassene, J. B. B. (2009). Implications des interactions noyaux cytoplasmes et de l'allopolypléidisation et sur l'expression phénotypique et génomique chez les agrumes (Doctoral dissertation, Université de Corse).
- [3] Allario, T. (2009). Identification de déterminants physiologiques et moléculaires de la tolérance à la contrainte saline et au déficit hydrique de porte-greffes autotétraploïdes d'agrumes (Doctoral dissertation, Corte).
- [4] Cameron, J., & Frost, H. B. (1968). Genetics, breeding and nucellar embryony. *The citrus industry*, 2, 325-370.
- [5] Ollitrault, P., Serra, D. D. R., *Citrus crops*. In *Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection*, 1992, pp 633-646, 651-653.
- [6] Cabasson, C. (1993). Régénération de la mandarine commune (*Citrus deliciosa Ten.*) par embryogenèse somatique en milieu liquide. Fusions somatiques et essais de transformation génétique. Université de Montpellier 2, Montpellier, FRANCE
- [7] Galiana, A., & Franche, C. (2004). La transformation génétique chez les arbres forestiers : principales stratégies utilisées et leurs applications. *Bois et forêts des tropiques* (282), 51-66.
- [8] Rugini, E., Gutierrez-Pesce, P., Spampinato, P. L., Ciarmiello, A., & D'Ambrosio, C. (1997, September). New perspective for biotechnologies in olive breeding: morphogenesis, in vitro selection and gene transformation. In *III International Symposium on Olive Growing* 474 (pp. 107-110).
- [9] Masuda, T., & Yoshioka, T. (1997). In vitro selection of a mutant resistant to *Alternaria* blotch disease in 'Indo'apple. *Techn. news*.
- [10] Murashige, T., & Tucker, D. P. H. (1969, March). Growth factor requirements of citrus tissue culture. In *International citrus symposium* (Vol. 1, pp. 1155-1169).
- [11] Peters, A. (1986). Quelques aspects de la morphogenèse des ignames cultivées in vitro. Mémoire de fin d'études de l'Institut Supérieur des Techniques d'Outre-mer (ISTOM), 74ème Promotion, 61 p.
- [12] B Altman, A., & Goren, R. (1974). Growth and dormancy cycles in Citrus bud cultures and their hormonal control. *Physiologia plantarum*, 30(3), 240-245.
- [13] Yeoman, M. M., & Aitchison, P. A. (1973). Growth patterns in tissue (callus) cultures. *Plant tissue and cell culture*, 240-268.
- [14] Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured. In vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, v. 11, p. 118-131.
- [15] Chaturvedi, H. C., & Mitra, G. C. (1974). Clonal propagation of Citrus from somatic callus cultures. *HortSci*.
- [16] Duran-Vila, N., Ortega, V., & Navarro, L. (1989). Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16(2), 123-133.



- [17] Huang, T., 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 and Organ Culture*, 69(2), 141-146.
- [18] Benyahia, H., Chetto, O., Dominique D., Froelicher, Y. (2012). Mise au point des conditions de calogénèse, caulogénèse et rhizogénèse chez les porte-greffes d'agrumes à partir d'épicotyle : cas du citrange Troyer. *Journal of Applied Biosciences* 60 : 4375 – 4387. ISSN 1997 –
- [19] Noronha, C., Romano, A., & Martin-Laução M.A., 1992. Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. *Ann. Bot.*, 70, 513-536.
- [20] Litz, R. E., Hendrix, R. C., Moon, P. A., & Chavez, V. M. (1998). Induction of embryogenic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2, 4-D and embryogenic nurse culture. *Plant cell, tissue and organ culture*, 53(1), 13-18
- [21] Label, K., Handaji, N., Brhadda, N., Elsalhi, E.,... & benyahia, H. (2015). Optimisation de l'induction de calogénèse à partir des embryons excisés de mandariniers (*Citrus spp.*). *Journal of Applied Biosciences*, vol. 89, no 1, p. 8300-8310.
- [22] Shawkat, A., Bushramirza 2006. Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. *Acta Bot. Croat.* 65 (2), 137–146
- [23] Das, A., Paul, A.K., Chaudhuri, S., 2000. Micropropagation of sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) for the development of nucellar seedlings. *Indian J. Exp. Biol.* 38, 269–72.
- [24] Jimenez V M (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant growth regulations* 47:91-110
- [25] Behar N., Kumar P., Chandel G. (2011). Effect of explant type, genotype and plant growth regulators on morphogenetic potential of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Cell and Plant Sciences*, 2 (1) : 13–18.
- [26] Haouala, F., Farhat, N., & Chabchoub, L. (2010). Effets du type et de la position de l'explant sur l'induction de cals chez le gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus). *Tropicultura*
- [27] Carimi, F., De Pasquale, F., & Crescimanno, F. G. (1995). Somatic embryogenesis in *Citrus* from styles culture. *Plant Science*, 105(1), 81-86.
- [28] Kochba, J., Spiegel-Roy, P., & Safran, H. (1972). Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus*. *Planta*, 106(3), 237-245.
- [29] Gmitter, F.G., & Moore, G.A. (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
- [30] Bugam F, Amin MN, Islam S, Azard MAK. & 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.
- [31] Benedito, V. A., Mourão Filho, F. D. A. A., & Mendes, B. M. J. (2000). Callus induction, somatic embryogenesis and protoplast isolation from sweet orange varieties. *Scientia Agricola*, 57(1), 33-38.
- [32] Meziane, M., Boudjeniba, M., Frasher, D., D'Onghia, A. M., Carra, A., Carimi, F.,... & Braneci, S. (2012). Regeneration of Algerian *Citrus* germplasm by stigma/style somatic embryogenesis. *African Journal of Biotechnology*, 11(25), 6666.