

Conditions de sélection *in vitro* des cals issus des disques foliaires et des protoplastes de *Pelargonium* tolérant plus la sécheresse

M. Mokhtari¹, N. Dorion², K. Ramdani¹

(Reçu le 27/09/2014; Accepté le 29/10/2014)

Résumé

Pour induire une résistance à la sécheresse, des cals issus de disques foliaires et de protoplastes de *Pelargonium x hortorum* ('Deep Salmon' et 'Panaché Sud') ont été cultivés en milieu *in vitro* riche en osmoticum. Le pourcentage de survie des cals dépend du milieu de culture, de la variété et de la concentration de l'osmoticum. Comparés aux protoplastes, les disques foliaires sont simples à manipuler. Cependant, la culture des protoplastes nécessite des additifs enzymatiques et des procédures plus délicates. La viabilité des protoplastes a été de 86% pour 'Deep Salmon' et de 90% pour 'Panaché Sud'. Le rendement a été de 5,67 x 10⁶ protoplastes/g.MF pour 'Deep Salmon' et 11,35 x 10⁶ pour 'Panaché Sud'. Les cals issus des disques foliaires de la variété 'Deep Salmon' ont survécu à une concentration maximale de 0,5 M de saccharose et 0,27 M de mannitol ou de sorbitol. La dose de 0,6 M de saccharose est le seuil limite pour la survie de 12,5% de protoplastes à un taux de division de 2% pour 'Deep Salmon' et 18,7% de protoplastes à un taux de division de 3,2% pour 'Panaché Sud'. Pour le mannitol, la limite maximale est à 0,6 M pour une viabilité de 13,5% de protoplastes à un taux de division 3,6% pour 'Deep Salmon' et 16,1% de protoplastes à un taux de division 3% respectivement pour 'Panaché Sud'. Le PEG à 20% a permis la survie de 21,1% de protoplastes et un taux de division de 0,2% chez 'Deep Salmon', mais il a totalement inhibé la division des protoplastes de 'Panaché Sud', même à 5%.

Mots-clés: *Pelargonium*, Protoplastes, Disques foliaires, *in vitro*, Cal, Sécheresse, Osmoticum, Saccharose, Mannitol, Sorbitol, PEG

Abstract

To induce drought resistance, callus from leaf discs and protoplast of *Pelargonium x hortorum* ('Deep Salmon' and 'Panaché Sud') were grown *in vitro* in osmoticum rich medium. Percent survival of the callus varied with growth medium, variety and concentration of osmoticum. Compared to protoplasts, leaf discs were simple to handle. However, protoplasts growing requires enzymatic additives and delicate procedures. The protoplasts viability was 86% for 'Deep Salmon' and 90% for 'Panaché Sud'. The yield was 5.67 x 10⁶ protoplasts / g FM for 'Deep Salmon' and 11.35 x 10⁶ for 'Panaché Sud'. The callus from leaf discs of the variety Deep Salmon survived a maximum concentration of 0.5 M sucrose and 0.27 M mannitol or sorbitol. A dose of 0.6 M sucrose was the threshold limit for the survival of 12.5% protoplasts with a division ratio of 2% for 'Deep Salmon' and 18.7% of protoplasts with a division ratio of 3.2% for 'Panaché Sud'. For the mannitol, the maximum limit was 0.6 M for a 13.5% viability of protoplasts with a division ratio 3.6% for 'Deep Salmon' and 16.1% of protoplasts with a division factor 3 % respectively for 'Panaché Sud'. The 20% PEG allowed the survival of 21.1% protoplast and a division rate of 0.2% in 'Deep Salmon', but it has totally inhibited protoplast division of 'Panaché Sud', even at 5%.

Keywords: *Pelargonium*, Protoplasts, leaf discs, *in vitro*, Cal, Drought, Osmoticum, Sucrose, Mannitol, Sorbitol, PEG

INTRODUCTION

Le géranium (*Pelargonium x hortorum*) est une espèce ornementale très populaire qui s'adapte à diverses utilisations. Vu le contexte mondial de l'eau, l'enjeu de créer des variétés résistantes à la sécheresse est devenue une priorité dans les programmes de recherches des institutions étatiques et privées. Le bouturage est la méthode de propagation la plus utilisée chez le *Pelargonium*, mais le semis est aussi utilisé chez quelques variétés. La culture *in vitro* est pratiquée pour assurer la multiplication clonale des génotypes élités (Vidalie, 1980). Elle est considérée comme une technique alternative efficace pour la recherche de nouvelles variétés (Hartmann *et al.*, 1998). On l'utilise pour l'induction de la résistance aux agents biotiques (bactéries et virus pathogènes) et abiotiques (sécheresse, salinité) par

hybridation somatique, variation soma-clonale ou par transformation génétique (Hartmann *et al.*, 1998).

La maîtrise des conditions de la culture *in vitro* est considérée comme une étape-clé dans la réussite de tout travail de création variétale (Robichon *et al.*, 1995; Nassour, 2003). Les techniques de régénération de plantes à partir des disques foliaires ont été largement utilisées en sélection. Cependant, il existe une grande variabilité de milieux selon le génotype et les objectifs de la culture. Le premier résultat visible de la prolifération des cellules à partir des disques foliaires est la formation d'un cal (callogenèse) qui précède la production d'embryons (Slimmon *et al.*, 1991). La composition du milieu (Gill *et al.*, 1993), sa concentration en hormones, l'environnement *in vitro* (Visser-Tenyenhuis *et al.*, 1994), le génotype, l'âge et le statut physiologique de l'explant sont les

¹ Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, CHA BP 18/S, 80.000 Agadir - Maroc. E-mail: mokhtari@iavcha.ac.ma

² I.N.H. 2 Rue Le Notre 49045 Angers Cedex 01 – France. E-mail: Noelle.Dorion@inh.fr

paramètres les plus importants pour la prolifération des tissus et la régénération du *Pelargonium* (Slimmon et al., 1991). L'induction des racines chez cette espèce requiert l'addition de deux régulateurs de croissance: auxine et cytokinine (Marsolais et al., 1991; Slimon et al., 1991; Madakadze and Senaratna, 2000).

La culture des protoplastes est aussi un outil potentiel pour développer des clones. Cette technologie est utilisée pour la création des variétés par mutagenèse, fusion somatique, variation soma-clonale et transformation génétique. Pour le *Pelargonium*, le tissu mésophyllien des jeunes feuilles est le matériel qui donne les meilleurs résultats (Maliga, 1984; Negrutiu et al., 1984; Nassour and Dorion, 2002). L'isolement de protoplastes viables doit se faire dans un milieu contenant des enzymes et des agents plasmolysants et ce, à des concentrations adéquates (Burger and Hackett, 1982). Nassour and Dorion (2002) ont développé une méthode d'isolement, de purification et de régénération des plantes à partir des protoplastes pour quelques variétés de *Pelargonium*. Les meilleurs résultats ont été obtenus après 21 jours de culture dans un milieu contenant des sels minéraux de Murashige and Skoog (1962), mais dilué de moitié (MS/2), 0,4% de cellulase Onozuka RS, 0,2% de pectinase et 0,5 M de mannitol. L'addition de MES (Morpholino-éthane-sulfonate) dans la solution enzymatique est largement employée pour stabiliser le pH durant la macération alors que le polyvinylpyrrolidone (PVP) favorise la survie des protoplastes (Dorion et al., 1994) et limite l'oxydation. Les colonies obtenues doivent être transférées sur un milieu gélosé pour la croissance et l'enracinement (Maheshwari et al., 1986).

L'objectif de ce travail est d'optimiser le milieu pour la callogenèse à partir de disques foliaires de deux génotypes de *Pelargonium* 'Deep Salmon' et 'Panaché Sud', d'une part, et d'étudier la réaction des protoplastes et des cals issus des disques foliaires à une sécheresse induite *in vitro* par augmentation de la pression osmotique et ce par l'addition de sucres ou du polyéthylène glycol (PEG), d'autre part. Le but global est de mettre au point des méthodes de sélection des plants résistants à la sécheresse à partir de divers processus *in vitro* comme l'hybridation somatique et la mutation induite.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal et milieu nutritif de base

Deux génotypes de *Pelargonium x hortorum* ('Deep Salmon' et 'Panaché Sud') ont été utilisés dans ce travail. Les explants (disques et protoplastes foliaires) ont été prélevés sur des plantes âgées de 3 à 4 semaines et cultivées *in vitro* dans des bocal d'un litre. La variété 'Deep Salmon' a été obtenue par semis suivi de repiquage et par micro-bouturage *in vitro*. La variété 'Panaché Sud' a été multipliée par micro-bouturage de pousses terminales *in vitro*. Avant le semis, les graines de 'Deep Salmon' ont été nettoyées à l'alcool 70°, désinfectées à l'aide d'une solution composée de 15% d'hypochlorite de sodium plus 1 ml/l de tween-80, puis rincées à l'eau distillée stérilisée. Le semis a été réalisé dans des tubes contenant 25 ml de milieu nutritif de base

suivant la méthode de Murashige and Skoog (1962), mais dilué de moitié (MS/2) pour les macro-éléments, avec les mêmes valeurs pour les micro-éléments et additionné de 3 vitamines (1 µg/l d'acide nicotinique, 0,2 µg/l d'aneurine et 0,2 µg/l de pyridoxine), 20 g/l de saccharose, 3 g/l de phytigel (Agar) et 0,5 mg/l d'acide indole acétique (AIA). Pour le micro-bouturage, le phytigel a été remplacé par 10 g/l de bactoagar et 2 g/l de charbon actif pour favoriser la croissance et la néoformation d'organes et éliminer les méfaits des phénols inhibiteurs engendrés par les blessures (Mansour, 2003). Une dose de 0,7 mg/l d'auxine (AIA) a été utilisée dans le but de favoriser l'enracinement des micro-boutures.

Conditions de culture des disques foliaires

Des disques foliaires de 3 mm de diamètre ont été prélevés sur des jeunes semis de "Deep Salmon" cultivés *in vitro* et ont été placés dans des boîtes de Pétri de 95 mm de diamètre contenant 20 ml d'un milieu gélosé. L'effet du milieu sur la croissance des disques foliaires et leur callogenèse a été évalué en utilisant deux concentrations de macro-éléments dérivés du milieu de Murashige and Skoog (1962) MS et MS/2 (MS dilué de moitié), deux types d'agar: 2 g/l de gelrite ou 3 g/l de phytigel et deux combinaisons d'hormones: C1 (0,2 mg ANA + 0,5 mg BAP + 0,5 mg zéatine) et C2 (0,2 mg ANA + 1 mg BAP + 1 mg zéatine). Les boîtes de Pétri contenant les disques ont été scellées avec des bandes de parafilm et soumises à des conditions de lumière (16 heures/jour) ou d'obscurité à une température de 22 ± 2°C. Les mesures (évolution du poids) ont été effectuées une fois par semaine pendant trois semaines.

Isolation, purification et culture des protoplastes

L'isolation, la purification et la culture des protoplastes ont été réalisées selon les protocoles décrits par Nassour (2003). Les limbes foliaires prélevés à partir de jeunes plantes âgées de 3 semaines *in vitro* (semis et micro-boutures pour 'Deep Salmon' et micro-boutures pour 'Panaché Sud') ont été désinfectés, hachés finement au scalpel et déposés (à raison de 40 à 50 mg de poids frais pour 1 ml de solution) dans une boîte de Pétri contenant 20 ml de solution enzymatique stérilisée par filtration à travers une membrane à micropores (0,22 µm de diamètre). La solution enzymatique est constituée de 4 g/l de cellulase et de 2 g/l de pectinase dissoutes dans un milieu de base (MS/2) avec 0,5% de polyvinylpyrrolidone (PVP-10, un antioxydant), 5 g/l de saccharose, 5 g/l de mannitol pour avoir une pression osmotique de 680 mOsm. Le tout a été ajusté à un pH de 5,8 par l'addition de 10 ml/l de MES (morpholinoéthane-sulfonate). Les boîtes ont été ensuite scellées et incubées à la lumière à 24°C pendant 6 h. À la fin de la macération enzymatique, la suspension a subi une agitation lente pendant 15 minutes. Ensuite, des échantillons d'1 ml par boîte de Pétri ont été dilués 5 fois dans un milieu salin de rinçage, le CPW (Cell and Protoplast Washing) contenant 0,5 M de mannitol avant de les filtrer sur un tamis de 63 µm et de les centrifuger (Centrifugeuse Jouan 4,22 R) à 60 g pendant 10 minutes. Le culot récupéré (1 à 2 ml) est alors dilué avec 10 ml de

CPW- saccharose et 1,5 ml de CPW-mannitol. Une série de trois rinçages suivis de centrifugations à 60 g pendant 10 minutes chacune a été réalisée.

Induction de la sécheresse chez les cals issus de disques foliaires et les protoplastes

Pour tester la réaction des cals (issus de disques foliaires) et des protoplastes à la sécheresse induite, différentes concentrations d'osmoticum (saccharose, mannitol et sorbitol de 0,2 jusqu'à 1,2 M) ont été ajoutées au milieu pour augmenter la pression osmotique du milieu afin de créer les conditions de stress. L'effet du PEG (polyéthylène glycol) a été testé chez les proptoplastes en utilisant des concentrations allant de 0 à 40%.

Conditions d'asepsie, suivis et mesures

Toutes les manipulations de culture des disques foliaires et d'isolement des protoplastes se sont déroulées sous hotte à flux laminaire horizontal stérile. Les milieux nutritifs de base, le matériel (papiers filtres, verrerie, pipettes, tamis métalliques, tubes à centrifugation) ont été stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 35 minutes. Les outils (scalpels, pinces et autres) ont été flambés à l'aide de l'alcool à 70° et désinfectés après usage dans un bain de Mucocit à 2% pendant 12 heures. La solution enzymatique, les régulateurs de croissance et les vitamines ont été stérilisés par filtration à travers une membrane stérile dont le diamètre des micropores est de 0,22 µm.

La croissance des disques foliaires et des cals en fonction des traitements a été suivie par mesure du poids des boîtes de Pétri. Pour les protoplastes, le suivi a été effectué par comptage sous microscope (Olympus BH-2, Japon) sous éclairage UV et après coloration au di-acétate de fluorescéine (FDA) à 0,01%. Le rendement et la viabilité des protoplastes (les protoplastes fluorescents sont vivants) ont été déterminés sur un effectif de 300 protoplastes par échantillon (4 échantillons par manipulation) à l'aide d'un hématimètre. Pour les protoplastes non colorés, les formes parfaitement sphériques avec des plastes bien répartis et une membrane apparemment intacte ont été considérées comme viables. La taille des protoplastes a été déterminée à l'aide d'un micromètre oculaire sur un minimum de 100 protoplastes.

RÉSULTATS

Effet du milieu sur la croissance des disques foliaires et leur callogenèse

Au début de la culture des disques foliaires, il n'y a pas eu de différence significative entre les types d'agar et c'est seulement à la fin de la 3^{ème} semaine que le phytigel a fini par avoir un effet meilleur que le gelrite sur la croissance des disques foliaires et sur le développement du cal (Figure 1-A).

Après 21 jours, la croissance des disques ainsi que leur callogenèse ont été favorisées par la dilution du milieu MS de base. Le milieu dilué MS/2 a causé une formation de cal égale au double de celle qui est mesurée dans le milieu MS normal (Figure 1-B).

Le taux de croissance des disques et des cals a été favorisé par l'obscurité (Figure 1-C). La lumière a partiellement inhibé la croissance des cals.

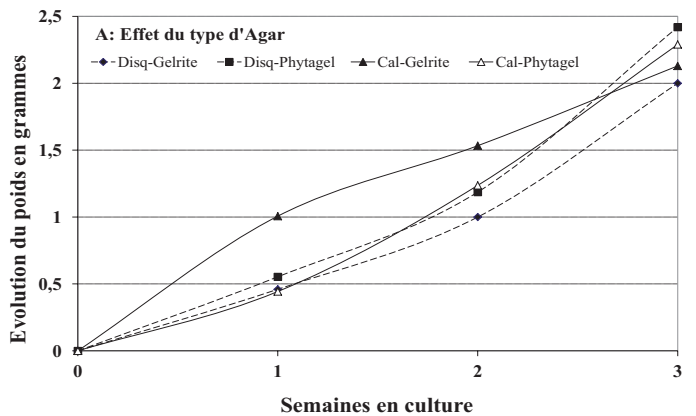


Figure 1-A: Effet du type d'agar sur la croissance des disques foliaires et leur callogenèse

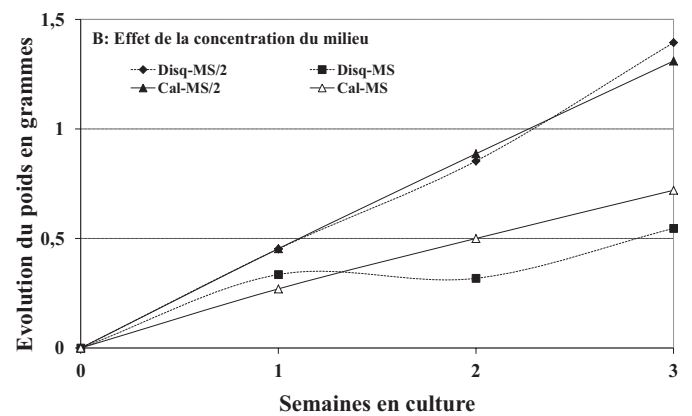


Figure 1-B: Effet de la concentration du milieu de culture sur la croissance des disques foliaires et leur callogenèse

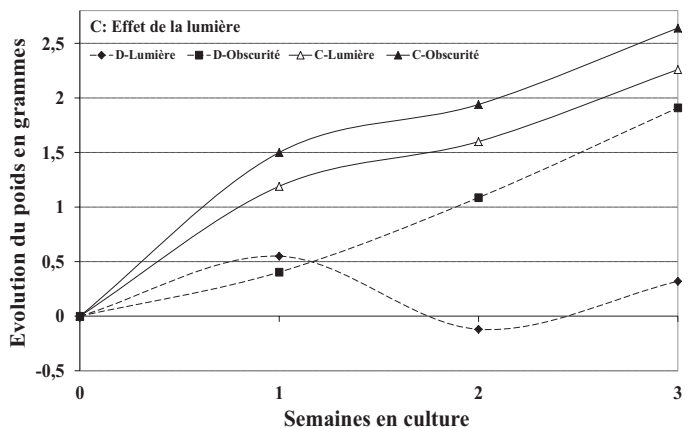


Figure 1-C: Effet de la lumière sur la croissance des disques foliaires et leur callogenèse

La meilleure croissance a été réalisée en présence de la combinaison (C2) la plus riche en cytokinines (contenant 1 mg/l de BAP et de zéatine au lieu de 0,5 mg/l chacune, Figure 1-D).

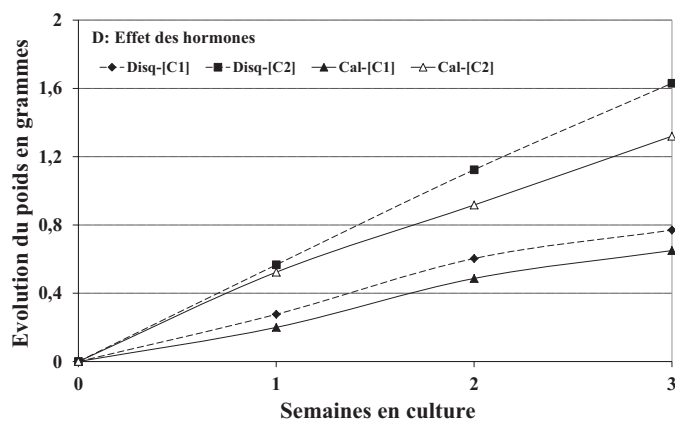


Figure 1-D. Effet des hormones sur la croissance des disques foliaires et leur callogenèse

Effet d'une sécheresse induite par les agents osmoplasmolysants (sucres) sur la survie et la croissance des cals

Le taux de croissance des cals (évolution du poids du cal néoformé) chez la variété 'Deep Salmon' est inversement proportionnel à la concentration en agent plasmolysant (sucres). Après 3 semaines, les cals ont pu résister à des concentrations inférieures à 0,58 M pour le saccharose et 0,32 M pour le mannitol et sorbitol (Figure 2).

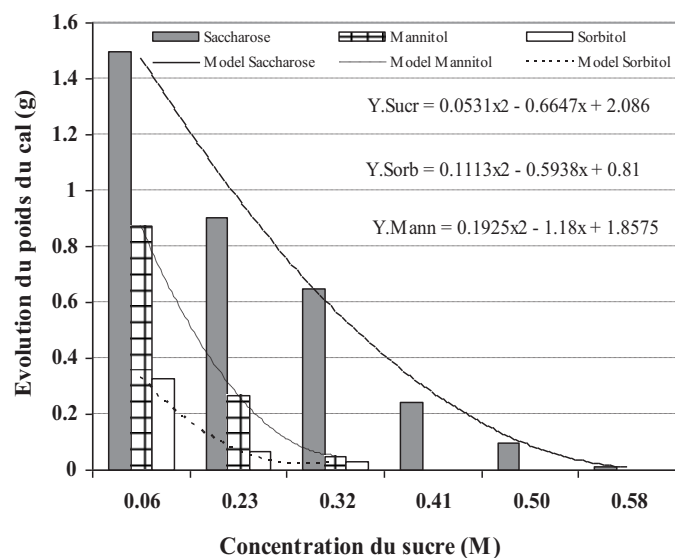


Figure 2: Effet des concentrations d'agents plasmolysants (saccharose, mannitol et sorbitol) sur la callogenèse chez 'Deep Salmon' (exprimée en gramme de cal produit après 21 jours)

Les cals de la variété 'Deep Salmon' survivent à des potentiels osmotiques plus élevés avec du saccharose qu'avec du mannitol et/ou du sorbitol. Apparemment, l'osmorégulation

chez cette variété est spécifique à l'agent plasmolysant. Après 3 semaines en milieu plasmolysant, et comparé au saccharose, le modèle quadratique de la réduction du potentiel de croissance du cal est deux fois plus élevé dans le cas du sorbitol et quatre fois plus dans le cas du mannitol (Figure 2).

Isolation et purification des protoplastes

Le pourcentage de viabilité et le rendement des protoplastes ont augmenté après des rinçages successifs (Tableau 1). Chez 'Panaché Sud', après deux rinçages, le maximum de viabilité des protoplastes est de 90,6%, le rendement de $11,35 \cdot 10^6$ P/g MF et leur plus grand diamètre est de 40,75 μ m. Les procédures d'isolation et de purification semblent ainsi être plus adaptées pour 'Panaché Sud' que pour le génotype 'Deep Salmon'.

Effet d'une sécheresse induite par les agents osmoplasmolysants (sucres et PEG) sur la survie et la division des protoplastes

Chez le témoin (sans sucres ni PEG), la viabilité des protoplastes est passée de 76,8 à 47,3% en 21 jours (Figure 3-A). À cette date, la dose de 1 M est létale pour les deux sucres (saccharose et mannitol).

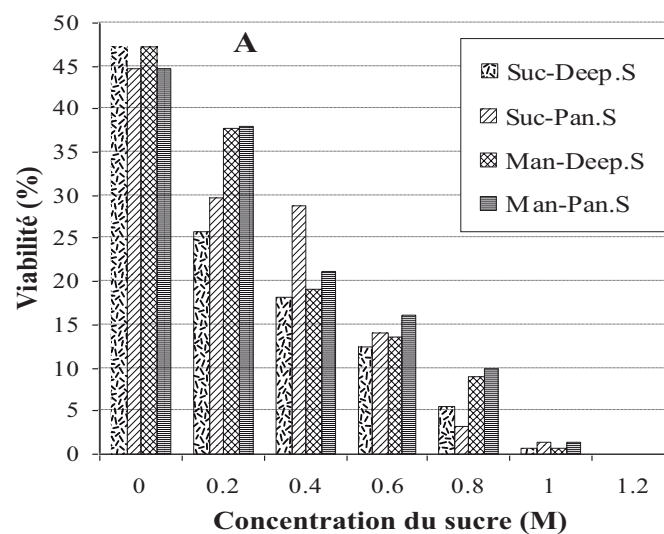


Figure 3-A. Effet des concentrations d'agents plasmolysants (saccharose, mannitol) sur la viabilité des protoplastes chez 'Deep Salmon' et 'Panaché Sud' après 21 jours en culture

La division est totalement inhibée à partir de 0,8 M (Figure 3-B). Après 3 semaines et à 0,8 M de sucre, la viabilité des protoplastes a été de 5,6% pour 'Deep Salmon' en présence de saccharose et de 10% pour 'Panaché Sud' en

Tableau 1. Viabilité, rendement et diamètre des protoplastes isolés à partir des feuilles de 3 semaines de deux génotypes de *Pelargonium x hortorum* ('Deep Salmon' et 'Panaché Sud')

	Viabilité (%)			Rendement X 10 ⁶ P/g MF	Diamètre (μ m)
	Après agitation	1 ^{er} rinçage	2 ^{ème} rinçage		
'Deep Salmon'	61,27 \pm 5,37	72,47 \pm 3,43	86,75 \pm 4,26	5,675 \pm 0,33	38 \pm 7,67
'Panaché Sud'	52,45 \pm 9,06	78,55 \pm 5,50	90,6 \pm 3,41	11,35 \pm 1,8	40,75 \pm 8,77

présence de mannitol. Le meilleur taux de division dépend du type du sucre et du génotype. À 0,6 M, la meilleure division (11,9%) a été obtenue pour ‘Deep Salmon’ avec du saccharose, alors que pour ‘Panaché Sud’ ce taux a été de 3% mais avec du mannitol (Figure 3-B).

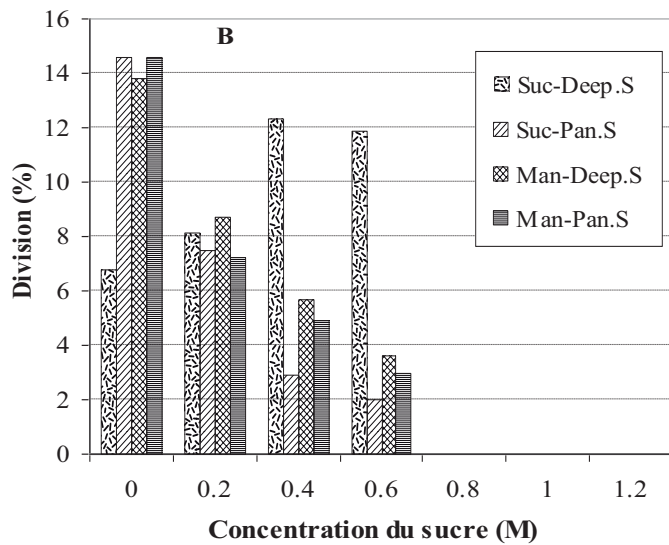


Figure 3-B. Effet des concentrations d’agents plasmolytiques (saccharose, mannitol) sur la division des protoplastes chez ‘Deep Salmon’ et ‘Panaché Sud’ après 21 jours en culture

Pour le PEG, la concentration létale a été de 30 à 40%. À la dose de 30%, le PEG a permis à 4,9% de protoplastes de survivre après 3 semaines de culture pour ‘Deep Salmon’ (Figure 4-A).

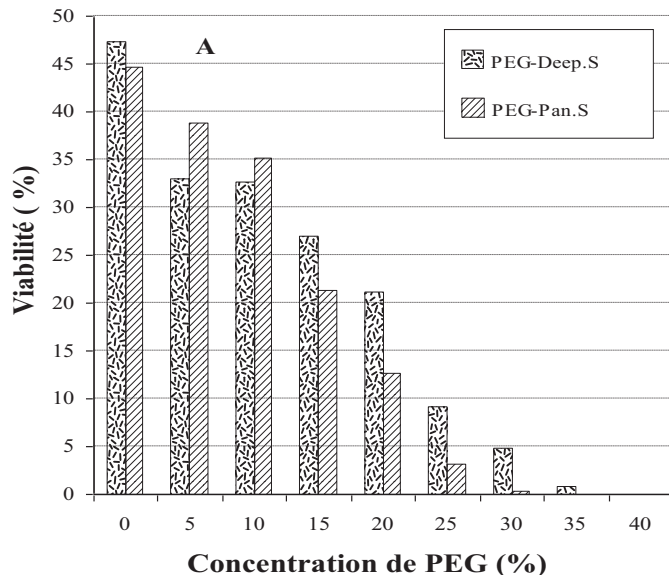


Figure 4-A. Effet des différentes concentrations de PEG sur la viabilité des protoplastes chez ‘Deep Salmon’ et ‘Panaché Sud’ après 21 jours en culture

Cependant, cette dose ne permet pas aux protoplastes de se diviser (Figure 4-B). Seuls les protoplastes de ‘Deep Salmon’ ont pu se diviser à des doses limites de 15 à 20% de PEG (0,8% de division à 15% de PEG et 0,2% de

division à 20% de PEG). Pour ‘Panaché Sud’, toutes les doses testées (qui sont > 0%) ont inhibé la division des protoplastes chez ce génotype.

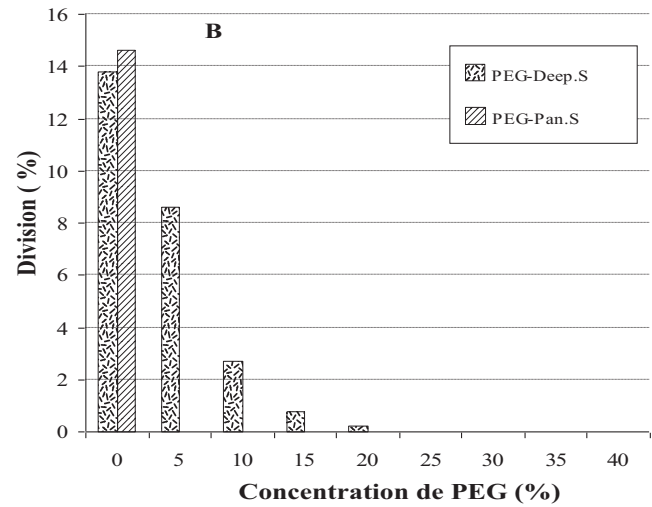


Figure 4-B. Effet des différentes concentrations de PEG sur la division des protoplastes chez ‘Deep Salmon’ et ‘Panaché Sud’ après 21 jours en culture

DISCUSSION

La callogenèse (à partir des disques foliaires) et la culture de protoplastes peuvent permettre dans un temps relativement rapide (21 jours) d’accéder à la mutagenèse *in vitro* chez *Pelargonium x hortorum*. La technique des disques foliaires, même si elle ne permet pas une maîtrise de la fusion directe des cellules, elle sera techniquement considérée comme étant la plus simple. En effet, elle ne fait pas appel à du matériel sophistiqué (un handicap au Maroc, vu les difficultés budgétaires pour l’achat et la maintenance du matériel de labo) ni à une technicité élevée. Les résultats obtenus sur le génotype ‘Alain’ (cultivar de *Pelargonium*) par Nassour *et al.* (2003) ont été légèrement supérieurs à ceux qui ont été réalisés sur les protoplastes dans le présent travail. Ces auteurs ont trouvé un rendement de 2.10^7 protoplastes/g.MF, un taux de division de 37% et un nombre des colonies formées de 31%. La différence des résultats peut être due à l’effet de l’explant (génotype), à la méthodologie de travail ou aux deux facteurs combinés. Les conditions des cultures et les agents osmoplasmolytiques se sont montrés, dans nos expériences, spécifiques aux génotypes. Les tests de routine d’optimisation des milieux de cultures sont nécessaires pour les différents génotypes. Ces tests restent le moyen le plus efficace pour toute recherche sur l’induction de la sécheresse ou tout autre type de résistance chez les cultivars du *Pelargonium x hortorum*. La création variétale reste avant tout tributaire de la réussite de la culture *in vitro* qu’on parte de disques foliaires ou de protoplastes.

RÉFÉRENCES CITÉES

Burger DW. and Hakett WP. (1982). The isolation, culture and division of protoplasts from citrus cotyledons. *Physiol Plant.* 56: 324-328.

- Dorion N., Ben-Jouira H. and Bigot C. (1994). Regeneration of plants from protoplasts of *Ulmus* species (Elms). *Biotechnol. Agric. Forest.*, 29: *Plant Protoplasts and genetic engineering V* (YPS Bajaj ed.), pp. 172-190.
- Gill R., Gerrath JM. and Saxena PK. (1993). High-frequency direct somatic embryogenesis in thin layer cultures of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*). *Can. J. Bot.* 71:408-413.
- Hartmann HT., Kester DE., Davies F. and Geneve RL. (1998). Methods of micropapagation Part IV In: "Plant Propagation, 6th edition", pp:549-624. Prentice Hall Inc. New Jersey.
- Madakadze RM. and Senaratna T. (2000). Effect of growth regulators on maturation of geranium (*Pelargonium x hortorum*) somatic embryos. *Plants Growth Regulation* 30:55-60.
- Maliga P. (1984). Isolation and characterization of mutants in plant cell cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:519-542.
- Marsolais AA., Wolson SPM., Tsujita MJ. and Senaratna T. (1991). Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium x hortorum*) and regal (*Pelargonium x domesticum*) geranium. *Can. J. Bot.* 69:1188-1193.
- Maheshwari SC., Gill R., Maheshwari N. and Gharyal PK. (1986). Isolation and generation of protoplasts from giber plants, In: "Results and Problems in cell differentiation: Differentiation of protoplasts and of transformed plants cells". Reinert J. and Binding H. (Eds), Springer-Verlag Berlin. Vol. 12, pp:3-35.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Nassour M. (2003). Étude sur les protoplastes de *Pelargonium x hortorum* Bailey et *Pelargonium x domesticum*; application à la production d'hybrides somatiques interspécifiques. Thèse de doctorat. Université d'Angers - INH., 137 pages + annexes.
- Nassour M., Chassériaux G. and Dorion N. (2003). Optimization of protoplasts-to-plant system for *Pelargonium x hortorum* 'Alain' and genetic stability of the generated plants. *Plant Science* 165:121-128.
- Nassour M. and Dorion N. (2002). Plant regeneration from protoplasts of micropropagated *Pelargonium x hortorum* 'Alain': Effect of some environmental and medium factors on protoplasts system efficiency. *Plant Sci.* 163:169-176.
- Negrutiu, I., Jacobs, M. and Caboche, M. (1984). Advances in somatic cell genetics of higher plants - the protoplast approach in basic studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. *Theor. Appl. Genet.* 67:289-304.
- Robichon MP., Renau JP. and Jalouzot R. (1995) Genetic transformation of *Pelargonium hortorum*. *Plant Cell Rep.* 15:63-67
- Slimmon T., Qureshi JA. and Saxena PK. (1991). Phenylacetic acid induced somatic embryogenesis in cultured hypocotyl explants of Geranium (*Pelargonium x hortorum* Baily). *Plan Cell Rep.* 10:587-589.
- Vidalie H. (1980). Origine et histoire des *Pelargonium x hortorum* et *Pelargonium hederaefolium*. *P.H.M. - Revue horticole* 198: 25-31.
- Visser-Tenyenhuis C., Murthy BNS., Odumeru J. and Sexana PK. (1994). Modulation of somatic embryogenesis in hypocotyl-derived cultures of geranium (*Pelargonium x hortorum* Baily) pp.110-143.