

**Essais de micropropagation du Citrange Troyer : *Citrus sinensis* L. x
Poncirus trifoliata L. (Raf.)**

KHELIFI-SLAOUI M. , ZIANE N. et KHELIFI L.

Laboratoire d'amélioration des plantes - Institut National Agronomique , El-Harrach.

Résumé : Des essais de micropropagation du Citrange Troyer sont réalisés à partir de microboutures d'environ 1 cm de longueur. Ces dernières sont prélevées sur des semis âgés de 2 ans cultivés en serre. Deux types de microboutures sont utilisés : boutures ligneuses, et boutures herbacées. Après désinfection, les microboutures sont ensemencées verticalement dans des tubes contenant 20 ml de milieu de base MB composé des éléments de MURASHIGE et SKOOG (1962) , de saccharose (50 g.l⁻¹) et solidifié avec la gélose (10 g.l⁻¹). D'autres milieux contenant des balances hormonales différentes sont également utilisés pour étudier leur effet sur la multiplication et sur l'enracinement. Les cultures sont soumises à une photopériode de 16 heures / 24 et une température de 25 °C ± 2°C. Les résultats obtenus montrent que les microboutures herbacées sont plus réactives que les microboutures ligneuses. De plus, le milieu M2 contenant uniquement de la BAP (0,5 mg.l⁻¹) s'est avéré favorable pour la caulogénèse. Le milieu M5 contenant du charbon actif (5 g.l⁻¹) et de l'ANA (1 mg.l⁻¹) induit un enracinement de 100 %. Les vitroplants enracinés sont acclimatés sur un substrat composé de vermiculite (1/3) et de tourbe (2/3). Le taux de reprise est de 100 %.

Mots clés : Acclimatation, Callogenèse, Citrange Troyer , Micropropagation , Rhizogénèse.

**Tests of micropropagation of Troyer Citrange : *Citrus sinensis* L. x
Poncirus trifoliata L. (Raf.)**

Abstract : Some micropropagation tests of Troyer Citrange were achieved starting from microcuttings of 1 cm of length. These last were preleved on some seedlings cultivated 2 years in tightens. Two types of microcuttings are used: woody tips and herbaceous tips. After decontamination, the plant material is cultivated in some tubes containing 20 ml of basis medium (MB) composed of the MURASHIGE and SKOOG (1962) elements, sucrose (50 g.l⁻¹) and solidified with agar (10 g.l⁻¹).

Some of other media containing some different hormonal balances were also tested in order to study their effect on the shoot multiplication and on the rooting. The cultures are exposed to a photoperiodic of 16 hours/ 24 and a temperature of $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. The results show that the herbaceous cuttings are more reactive than the woody cuttings, and the medium M2 containing BAP ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) averred most favorable for the caulogenesis. The medium M5 containing activated charcoal (5 g.l^{-1} and NAA (1 mg.l^{-1}) induced 100% of rooting. The vitroplants rooted are then acclimatized on a composed substrat : vermiculite (1/ 3) and peat (2/ 3). The surviving rate averaged 100%.

Keys words : Acclimatization, Callogenesis, Micropropagation, Rhizogenesis, Troyer Citrange.

INTRODUCTION

Les agrumes occupent une place de choix dans les exportations des produits agricoles. Il est inutile d'insister sur l'intérêt économique considérable que constituent leurs fruits appréciés dans le monde entier.

L'Algérie qui occupait une place importante à l'échelle mondiale a connu et connaît encore une régression dans sa production et ses rendements en agrumes ce qui a conduit à une baisse de la commercialisation tant sur le marché intérieur que sur le marché extérieur. Les facteurs responsables de cette régression sont nombreux : âge relativement avancé du verger, insuffisance des soins culturaux, insuffisance des moyens financiers, déficit hydrique aggravé par l'état défectueux des réseaux d'irrigation, inefficacité des réseaux de drainage etc. Il est donc impératif de songer à la rénovation et/ou à la reconstitution des vergers agrumicoles en vue de maintenir voire d'améliorer la production nationale.

Pour cela, il est indispensable de faire appel aux techniques d'amélioration et de multiplication susceptibles de fournir des plants de qualité certifiés aussi bien pour les caractères agronomiques (rendements, qualités organoleptiques etc..) que pour les autres caractères tels que l'adaptation à des régions spécifiques, la résistance aux maladies (exocortis, tristéza...) ou à des ravageurs (mineuse des feuilles d'agrumes).

Ce travail s'inscrit dans un programme d'amélioration des techniques de production de plants fruitiers lancé par le département de phytotechnie de l'INA

(Alger). Il vise la mise au point d'une technique de multiplication in vitro de plants d'agrumes microgreffés en vue de produire des plants rajeunis et assainis tout en conservant leur entité génétique de départ. Les avantages de cette technique sont considérables notamment pour l'assainissement (par culture de méristèmes associée à une thermothérapie) des variétés atteintes de maladies bactériennes ou virales, pour la création variétale (par le biais des variations somaclonales) ainsi que pour la multiplication conforme (par microbouturage).

La première étape de ce travail consiste à mettre au point un milieu de culture pour la micropropagation du porte greffe Citrange Troyer afin de produire des vitroplants enracinés et acclimatables. Le matériel obtenu sera utilisé ultérieurement pour le microgreffage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel végétal utilisé Citrange troyer : *Citrus sinensis* L. x *Poncirus trifoliata* L. (Raf.) a été fourni par la pépinière du GDSP de Cinq Maisons El -Harrach.

Deux types d'explants sont utilisés : des tiges principales lignifiées et des rameaux herbacés de 1 cm de long, portant au moins un bourgeon axillaire. Ils sont issus de semis âgés de 2 ans. Avant d'être introduits in vitro, ces explants (microboutures) sont d'abord soumis à une prédésinfection au mercryl laurylé pendant 10 minutes puis désinfectés à l'hypochlorite de sodium (12° Chlorométriques) pendant 20 minutes. Deux rinçages à l'eau distillée stérile s'ensuivent.

Le milieu de culture de base (MB) adopté est constitué des macro, micro et vitamines de MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962). Ce milieu a déjà été utilisé pour la majorité des travaux « in vitro », sur différents tissus de *Citrus* [NAVARRO et al en 1975 pour le microgreffage, JUAREZ et al en 1985 pour l'embryogenèse somatique, STARRANTINO et CARUSO en 1987 pour la micropropagation]. Ce milieu contient, en outre, du saccharose (50 g.l⁻¹) et est solidifié avec de la gélose (10 g.l⁻¹). Avant d'être stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes, le milieu de culture subit un ajustement du pH à 5.6.

Différentes combinaisons hormonales avec ou sans charbon actif sont testées

MB : Milieu MS + 50 g .l⁻¹ de saccharose + 10 g .l⁻¹ d'Agar,

M2 : MB + 0.5 mg .l⁻¹ de Benzyl-Amino-Purine (BAP),

M3 : M2 + 0.25 mg .l⁻¹ d'Acide Indole Butyrique (AIB).

Deux milieux sont utilisés pour l'induction de la rhizogenèse :

M4 : MB + 1 mg .l⁻¹ d'Acide Naphtalène Acétique (ANA)

M5 : M4 + 5 g .l⁻¹ de charbon actif

Les microboutures sont ensemencées verticalement à raison d'une par tube contenant 20 ml de milieu, puis placées dans une chambre de culture où elles sont soumises à une photopériode de 16/24 heures et une température de 25°C ± 2°C. Le nombre de répétition par traitement est de 16.

Pour tous les traitements effectués, un transfert sur un milieu frais (identique au milieu d'introduction primaire) est réalisé tous les 30 ± 2 jours après avoir éliminé l'explant mère. Lors des transferts suivants, le cal à la base du vitroplant est aussi éliminé, excepté lors du dernier transfert sur le milieu de rhizogenèse.

L'effet des milieux testés est étudié sur la base des mesures effectuées sur l'élongation et sur le nombre de noeuds portés par les vitroplants.

Les vitroplants enracinés après deux à quatre mois de culture sont débarrassés de la gélose, puis repiqués dans des fertiles-pots remplis de substrat (1/3 de vermiculite + 2/3 de tourbe) préalablement fertilisé (macro et micro-éléments de MS) puis désinfecté (à l'autoclave à 120°C pendant 1 heure). Les fertiles-pots sont placés, dans une chambre de culture (lumière et température données ci dessus), sous une cloche en plexiglas également désinfectée à l'eau de Javel (12°) puis à l'alcool 96°.

Des arrosages à l'eau courante sont effectués par la suite tous les dix jours afin de maintenir une bonne humidité relative, dans la cloche, indispensable à la réussite de l'acclimatation.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Effet de la nature des explants

Depuis le début de l'expérimentation il s'avère que les explants lignifiés sont moins réactifs car ils manifestent une réaction de brunissement (malgré leur transfert sur un milieu frais) due à une libération de polyphénols dans le milieu. Ce brunissement pourrait être dû à l'oxydation des polyphénols conduisant à la formation de quinones dont l'effet se traduit par une inhibition de la croissance des explants puis leur dépérissement.

L'âge des tissus est l'une des causes du brunissement : les tissus les plus jeunes brunissent moins que les tissus âgés lignifiés (AIT-CHITT, 1989). En effet,

dans le cas du Citrange Troyer, les explants herbacées sont plus réactifs et n'ont pas manifesté de brunissement. Ils sont donc retenus pour la suite de l'expérimentation.

Effet de la composition en régulateurs de croissance du milieu de culture

- Multiplication et développement des plantules

Les meilleurs résultats sont obtenus sur le milieu M2 contenant $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP (fig. 1 et fig. 2 A et B) avec un nombre moyen de noeuds par explant égale à 6.25 et une élévation moyenne de 19.06 mm après un mois de culture. L'analyse statistique confirme bien cet effet significatif favorable du milieu M2 sur les 2 paramètres étudiés.

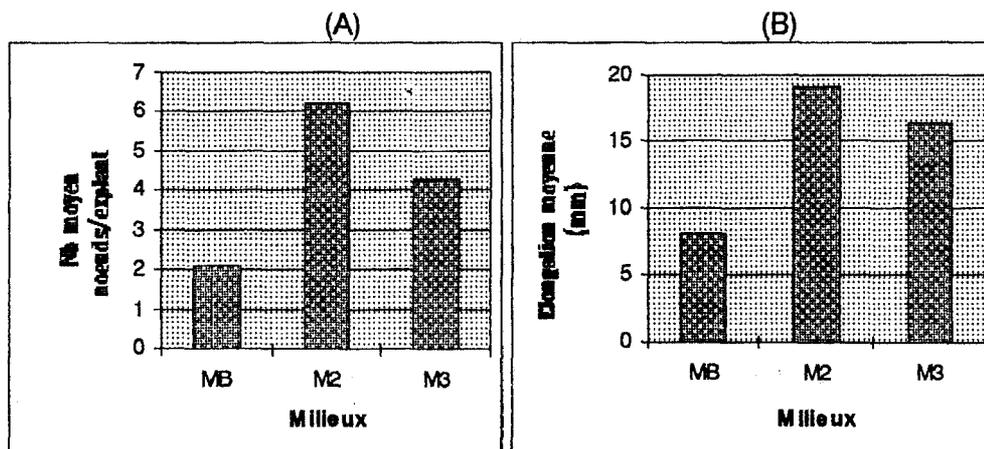


Figure 1. Effet du milieu de culture sur le développement des pousses produites in vitro

- (A) : Nombre moyen de noeuds / explant ($F_c = 34.64$, $ddl = 2$ et 54 , Effet significatif)
- (B) : Elongation moyenne en mm ($F_c = 71.29$, $ddl = 2$ et 54 , Effet significatif).

ABROUS (1983) a obtenu environ 4 bourgeons par explant sur la même espèce. SIM et al en 1989 ont obtenu 2,3 bourgeons en moyenne après six semaines de culture, avec des microboutures de *Citrus mitis* et avec une concentration de 0.5 mg.l⁻¹ de BAP dans le milieu MS. MAIZA en 1980, en utilisant des microboutures de quelques variétés de *Citrus* avec le milieu MS additionné de 1 mg.l⁻¹ de BAP a pu produire 3 à 4 bourgeons en moyenne pour le *Citrus simensis*, « var. HAMLIN », 5 bourgeons en moyenne pour « var. Mme VINOUS », et 3 bourgeons en moyenne pour le *Citrus limon* « var. Eureka ». Les résultats obtenus avec le Citrange Troyer sont donc légèrement supérieurs à ceux obtenus par ces auteurs, bien que le milieu ne contient que 0.5 mg.l⁻¹ de BAP.

Par ailleurs, il est établi que le rapport cytokinine sur auxine en faveur des cytokinines permet aux bourgeons axillaires de se développer à leur tour et de concurrencer le bourgeon apical (BOXUS, 1989). En effet, dans nos conditions, l'addition de la BAP (0,5 mg.l⁻¹) et de l'AIB (0,25 mg.l⁻¹) au milieu de base MB (milieu M3) améliore les résultats pour les deux paramètres étudiés. Cependant, les résultats restent inférieurs à ceux obtenus sur le milieu M2 contenant uniquement 0,5 mg.l⁻¹ de BAP. Ces résultats corroborent ceux obtenus par MAIZA en 1980 ainsi que par ABROUS en 1983 (sur les microboutures citées précédemment) qui ont constaté que l'utilisation d'une combinaison de BAP (1 mg.l⁻¹) et d'AIA (0,1 mg.l⁻¹) n'améliore pas les résultats par rapport à ceux obtenus avec uniquement 1 mg.l⁻¹ de BAP.

Le milieu M2 permet donc de réaliser une bonne multiplication puisqu'à partir d'une même bouture initiale on parvient à en produire en moyenne 5 au bout d'un mois de culture. Ce milieu est alors retenu pour la suite du travail.

Callogenèse

La callogenèse à la base des explants est observée sur les 3 milieux MB, M2 et M3. Les cals obtenus sont compacts et de couleur verdâtre à blanchâtre et de dimension variable. Les meilleurs résultats (fig. 2C) sont obtenus aussi bien sur milieu M2 (cal d'environ 1 cm de diamètre) que sur MB (cal d'environ 0,7 cm de diamètre) après environ un mois de culture.

En outre, une callogenèse d'un aspect jaunâtre, s'étendant parfois à l'ensemble de l'explant, est également obtenue à l'extrémité supérieure des microboutures. Dans ce cas, les milieux MB et M2 s'avèrent également callogènes. Par contre, sur le milieu M3, la callogenèse à l'extrémité supérieure est presque négligeable aussi bien en fréquence qu'en volume des cals.

MAIZA, en 1980, a également remarqué une importante callogenèse, sur des tronçons longitudinaux de quelques variétés de *Citrus*, sur le milieu MS contenant 1 mg.l⁻¹ de BAP. Cependant le même auteur, avec le même type d'explants cultivés sur un milieu contenant 1 mg.l⁻¹ BAP + 0,1 mg.l⁻¹ d'AIA signale

une très faible callogenèse, ce qui rejoint parfaitement nos résultats.

Par ailleurs, sur le milieu M2, l'un des explant a manifesté une caulogénèse suite à une néoformation de bourgeons à partir du cal formé à son extrémité supérieure (fig. 2D). Ces bourgeons néoformés évoluent en une touffe de vitroplants avec une morphogénèse particulière (forme et couleur des feuilles différentes de celles des plante-mères).

Seuls les bourgeons d'origine axillaire sont utilisés dans la suite de l'expérimentation.

Rhizogénèse

Sur le milieu MB, 27 % des boutures manifestent un enracinement spontané. Les racines obtenues apparaissent après le transfert des explants sur un milieu frais (fig. 2E).

Il est actuellement admis que des auxines endogènes sont synthétisées au niveau des bourgeons et des jeunes feuilles. Elles sont ensuite acheminées vers la base de la tige pour y induire le développement des racines. En effet, FAVRE (1977) a signalé que les auxines s'accumulaient au niveau des noeuds où le développement des racines est fréquent. Par ailleurs, LAFON et al en 1988 ont signalé la présence d'autres substances à activité auxinique chez les plantes, il s'agirait de l'acide phénylacétique favorisant la rhizogénèse.

Avec les vitroplants cultivés sur les deux autres milieux (M2 et M3) aucune rhizogénèse spontanée n'a été observée. Ceci rejoint les résultats d'ABROUS en 1983 pour qui, le milieu contenant de la BAP et de l'AIA ne favorise pas l'induction racinaire.

Sur le milieu M4 (MB + ANA : 1 mg.l^{-1}), 40 % des vitroplants s'enracinent. Ce taux est faible par rapport aux résultats de STARRANTINO et CARUSO (1987) qui, avec la même concentration d'ANA (1 mg.l^{-1}) obtiennent 95 % d'enracinement après 15 jours d'induction. Par contre, avec le milieu M5 (MB + ANA : 1 mg.l^{-1} + charbon actif : 5 g.l^{-1}), les vitroplants présentent 100 % d'enracinement. Il est donc clair que le charbon actif et/ou l'association d'ANA et de charbon actif améliorent considérablement la rhizogénèse. Ces résultats rejoignent ceux de MAIZA en 1980 chez le citronnier « var. Eureka ».

Acclimatation

L'acclimatation constitue l'étape la plus délicate après la vitropropagation. Elle consiste à transférer les vitroplants du milieu de culture gélosé sur un substrat qui doit être le plus léger et le moins contaminé possible.

Après deux semaines d'acclimatation sur le substrat (décrit en matériel et méthodes) la reprise des vitroplants est de 100 %. Les plantules acclimatées s'allongent normalement. Parallèlement à ce développement, les feuilles nouvellement formées sont plus larges et de couleur plus verdâtre (fig. 2F). Leur système racinaire continue à se développer en formant des racines secondaires.

CONCLUSION

Pour les deux paramètres considérés, après 34 jours de culture, le milieu M2 contenant $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP s'avère plus favorable que les deux autres milieux MB et M3. Le nombre moyen de noeuds par explant réactif et l'élongation moyenne atteignent, en 4 semaines de culture, respectivement 6,25 et 19,06 mm. Dans ces conditions, il est possible de produire environ 4 à 5 microboutures par explants de départ et par mois.

Chez le Citrange Troyer, des cals se développent sur l'ensemble des milieux testés, même en absence d'hormones de croissance : c'est une particularité des agrumes (MAIZA, 1980). En outre, les cals obtenus développent, dans certains cas, des bourgeons néoformés. Ce dernier type d'organogenèse présente une source non négligeable de variabilité génétique, recherchée en amélioration des plantes (DEMARLY, 1985 et NOZERAN, 1985) et plus particulièrement l'amélioration des *Citrus* dont le degré de variabilité génétique actuel est restreint limitant les possibilités d'amélioration ultérieures par la voie classique (OLLITRAULT et FAURE, 1992).

Sur le milieu MB, 27 % des vitroplants allongés présentent une rhizogenèse spontanée. Mais, le meilleur taux d'enracinement (100 %) est obtenu après induction par addition de 1 mg.l^{-1} d'ANA au milieu de culture MB contenant 5 g.l^{-1} de charbon actif. Le sevrage des vitroplants enracinés ne pose pas de problème particulier.

La suite du travail consiste encore à optimiser les milieux de multiplication et d'enracinement et de les tester ensuite sur les autres porte-greffes utilisés en Algérie. L'objectif visé est la régénération, après assainissement et rajeunissement par microgreffage de méristèmes, de quelques variétés d'agrumes cultivées en Algérie.



Figure 2. Etapes de la micropropagation de Citrange Troyer (A : microboutures initiales, après une semaine de culture ; B : pousses produites sur les microboutures initiales, après isolement et transfert ; C : cals à la base des pousses ; D : cals portant des bourgeons néoformés ; E : enracinement des vitoplants ; F : acclimatation des vitroplants)

Références

ABROUS M., 1983 – Contribution à l'étude de la culture in vitro de trois porte greffes d'agrumes : *Citrus aurantium* L. *Poncirus trifoliata* L. (Raf.) et Citrange Troyer ; Thèse DEA Production et traitement des matières végétales ; 107p.

AIT-CHITT M., 1989 – Problèmes rencontrés en culture in vitro du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par la techniques d'organogenèse. Compte rendu du deuxième séminaire maghrébin sur la multiplication rapide du palmier dattier par les techniques de culture in vitro; Projet de lutte contre le Bayoud FAO/PNUD ; Marrakech octobre 1989 ; 142 p ; 9-12.

BOXUS P., 1989 – La multiplication in vitro une biotechnologie intéressante pour le développement des perspectives industrielles ; Ann. Gembloux ; 95 ; 163 – 181.

DEMARLY Y., 1985 – L'épigénique . Colloque 31 Aout au 4 Septembre 1981 Fontainebleau; 363p ; ; Bull. Soc. Bot. Fr. Actual ; 79 – 94.

FAVRE J.M., 1977 – La rhizogenèse : Aspects divers du processus d'organogenèse végétale ; Annales de l'université d'Abidjan, Série Sciences ; 100p.

JUAREZ J., NAVARO L. et GUARDIOLA J.L., 1985 – Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentinier au moyen de la culture de nucelles in vitro ; Fruit ; 31 ; 12 ; 751-762.

LAFON J.P., THARAUD-PRAYER C. et LEVY G., 1988 – Biologie des plantes cultivées ; Tome 2 : Physiologie de développement ; Génétique et amélioration ; Edition Technique et documentation , Lavoisier ; Paris ; 167 p.

MAIZA F., 1980 – Analyse des aptitudes organogénétiques de plusieurs variétés de Citrus en vue d'aboutir à leur multiplication végétative in vitro ; Thèse doctorat 3eme cycle ; 76 p.

MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962 – A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture ; *Physiol Plant* ; 15 ; 473 – 497.

NAVARRO L., ROISTACHER C.N. et MURASCHIGE T.S., 1975 – Improvenant of shoot tipgrafting in vitro of virus free Citrus ; J. Amer. Soc. Hort. Sci. ; 100 (5) ; 471 – 479.

NOZERAN R., 1985 – L'expression de la variabilité dans les cultures d'organes ; Bull. Soc. Bot. Fr. ; 132 Actual. bot. (314) ; 17 – 21.

OLLITRAULT P. et FAURE X., 1992– Système de reproduction et organisation de la diversité génétique dans le genre *Citrus* ; Colloque Int. Complexe d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes ; 8 – 10 Janvier ; Paris ; Publication BRG; 135 – 151.

STARRANTINO A. et CARUSO A., 1987 – Experiences on the in vitro propagation of some Citrus root stocks ; Acta Horticulturae ; 212 (187) ; 471 – 474.