

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP- DAKAR



MEMOIRE pour l'obtention du DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

présenté à la Faculté des Sciences
Département de Biologie Végétale
par

OUSMANE M'BODJI

Maître ès Sciences

SUJET :

Mise en place d'une méthodologie de clonage chez *Citrus sp* :
Culture de méristème et Microgreffage *in vitro*

Soutenu le 23 Novembre 1995
devant la Commission d'Examen composée de :

Président : Mr. Amadou Tidiane Bâ Professeur titulaire

Membres : Mr. Alain Borgel Chargé de Recherche ORSTOM

Mr. Mékinto Batcho Maître de conférence

Mme. Yaye Kène Dia/Gassama Maître-assistante

Mr. Massaër N'Guer Chercheur à l'ISRA

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé conjointement au laboratoire commun à l'ISRA et l'ORSTOM (URCI) du centre de Bel-Air et au Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

Le sujet proposé par ce Département avec la collaboration étroite de l'URCI a été traité sous la responsabilité scientifique de Mr. Alain Borgel, chargé de Recherche à l'ORSTOM et de Mme Yaye Kène Gassama-Dia, Maître-Assistante au Département de Biologie Végétale de l'UCAD.

Nous tenons à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont permis la réalisation de ce travail, en particulier :

Mr. Amadou Tidiane Bâ, Professeur titulaire, chef du Département de Biologie Végétale, pour la confiance que vous nous avez témoignée en facilitant notre admission à l'ORSTOM.

Mr. Philippe Mathieu, Représentant de l'ORSTOM au Sénégal pour avoir accepté notre admission dans votre établissement.

Mr. Alain Borgel, Responsable de l'URCI, chargé de Recherche à l'ORSTOM pour avoir accepté spontanément de diriger ce travail. Nous avons admiré en vous votre disponibilité et votre esprit critique tout le long de notre stage. Notre fin de stage coïncidant avec votre départ du Sénégal, nous profitons de cette occasion pour vous souhaiter un bon retour en France.

Mme Yaye Kène Dia/Gassama, Maître-Assistante au Département de Biologie Végétale pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de diriger ce travail. Vous avez guidé nos balbutiements sur la technique d'excision de méristème avec patience. Nous avons apprécié votre rigueur et votre sens pédagogique tout au long de ce stage.

Mr. Mékinto Batcho, Maître de Conférence au Département de Biologie Végétale, pour avoir accepté de juger ce travail.

Massaër N'guer, Chercheur à l'ISRA pour avoir accepté de faire partie du jury. Votre assistance pédagogique et matérielle nous a été très précieuse.

Nous tenons à remercier tout le personnel de l'URCI, en particulier Mahécor Diouf, Technicien pour son dévouement et sa disponibilité.

Nos vifs remerciements s'adressent également à Maurice Sagna, Sidy N'Diaye, Amy Bâ Diop, Abdou Sarr, Ismaïla Diarra, Marie Claire Da-Sylva, Alioune Faye, Pierre Sagna, N'Gagne Sow, Stéphane Rondeau, Alioune Diallo, Talla Guèye, Djibril Sané, Diaminatou Sanogo, Mamour Seck, Moussa Sidibé, Khadidiatou N'Doye, Abdoulaye Dieng pour avoir été les véritables artisans de ce travail. Nous n'oublierons jamais la parfaite harmonie qui a marqué notre existence commune.

Enfin à tous les amis, Adama N'Diaye, Diène N' Diaye, Mor Talla Lô, Thierno N'Diaye, Tahar Konaté, Daouda M'bow, Thierno Agne, Mame Birame Diouf, Thierno Diouf, Moussa N'Gom, Yaye Gnakhana N'Dour, Safiétou Thiam, Ami N'gom, Oulimata Djiba, Marie Sybi, Alioune M'Backé, Sadio Cissé, Modou Diarra, Djibril Bâ, Mamadou Souané, Lassana Diarra, Mamadou Fall, Djim Diassé, Baye Kébé, Békaye Keïta, Ousmane Kébé, Mansour Dia, Collé Seck, Lindor Diop, pour les moments d'angoisse et de joie passés ensemble.

DEDICACE

A la mémoire de mon père, toi qui a été notre premier maître.

A mes mamans à l'affection profonde et sans limite.

A mes frères et soeurs.

A mes cousins et cousines.

A mes tantes et oncles.

RESUME

TITRE : Mise en place d'une méthodologie de clonage chez *Citrus sp.* : Culture de méristème et microgreffage *in vitro*.

La culture de méristème a été réalisée dans trois perspectives : a) l'étude du fonctionnement du méristème, b) la reconstitution de clones indemnes de virus à partir de plantes-mères infestées, c) la propagation végétative. Le microgreffage est venu en appoint à cette technique pour résoudre les problèmes de réactivation du méristème et d'enracinement des microboutures obtenues chez les ligneux. Dans le domaine des cultures fruitières et principalement chez les agrumes, il est devenu une exigence, une fois les critères de productivité réalisés, d'y allier la qualité du produit. La culture de méristème et le microgreffage *in vitro* assurent dans la plupart des cas, la reconstitution de clones homogènes et assainis. Le travail présenté porte sur plusieurs espèces du genre *Citrus* : *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus grandis* (L.) Osbeck, *Citrus limon* (L.) Burm. F., *Citrus reticulata* Blanco, (variétés locales), *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus paradisi* (Macf.), *Citrus aurantifolia* (Chrism.) Swingle, *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*, (variétés améliorées). Il comprend trois parties : 1) Germination des graines. Il y'a une nette différence dans les délais à faire germer les graines allant de 25 jours à 3-10 jours entre graines intactes et graines décortiquées ou incisées. Le taux de germination diminue nettement avec le temps de conservation des graines. 2) Culture de méristème. Une influence très significative est notée sur la réussite de la culture de méristème suivant que le matériel végétal est jeune ou âgé. L'initiation de méristème et l'enracinement des microboutures obtenues après deux subcultures ont été réalisés avec du matériel végétal jeune, contrairement au matériel végétal âgé où l'étape de l'initiation n'a pas pu être franchie. L'enracinement des microboutures obtenues est meilleur lorsque le milieu de culture contient de l'AIB par rapport à l'ANA. 3) Microgreffage. La motte "Mil-Cap" est meilleure que le pont de papier filtre pour servir de support au porte-greffe. Le microgreffage a été réussi à la fois avec du matériel végétal jeune et âgé, contrairement à la culture de méristème.

Mots clés : clones sains; Virus; Propagation végétative; Enracinement; Microgreffage; Microboutures; Ligneux; *In vitro*; *Citrus sp.*; Germination; Matériel végétal jeune; Matériel végétal âgé; Auxines

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET PLANCHES DU TEXTE.....	8
LISTE DES TABLEAUX DU TEXTE.....	9
INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS DU TEXTE.....	11
INTRODUCTION GENERALE.....	12
A. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
I. REGENERATION DE PLANTULES A PARTIR DE LA CULTURE <i>IN VITRO</i> DE MERISTEME.....	15
1. Culture de méristème ou d'apex utilisée comme technique de recherche expérimentale.....	15
2. La culture de méristème ou d'apex en vue de la multiplication végétative.....	15
3. La culture de méristème et la reconstitution de clones sains.....	16
4. Autres applications de la culture de méristème.....	17
5. Le microgreffage.....	17
5.1. Facteurs affectant la réussite du microgreffage.....	18
5.1.1. Facteurs liés au porte-greffe.....	18
5.1.2. Facteurs liés au greffon.....	18
5.1.3. Facteurs liés à la technique du greffage.....	18
5.1.4. Autres facteurs.....	18
II. ETUDE DES FACTEURS LIES A LA CULTURE DE MERISTEME.....	19
1. Structure anatomique du méristème de tige.....	19
2. Taille des explants.....	20
3. Milieu de culture.....	20
4. Condition d'incubation.....	21
5. Epoque de prélèvement des explants.....	22
6. Enracinement des explants.....	22
6.1. Auxines et enracinement.....	23
6.2. Autres facteurs de l'enracinement.....	23
B. MATERIELS ET METHODES.....	25
I. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	25

1. La plante.....	25
1.1. Position systématique.....	25
1.2. Caractères botaniques.....	26
1.3. Ecologie.....	27
2. Provenance du matériel biologique.....	28

II. LES CONDITIONS DE CULTURE.....29

1. Préparation du matériel biologique.....	29
1.1. Préparation du matériel jeune.....	29
1.2. Préparation du matériel adulte.....	29
2. La multiplication végétative.....	30
2.1. Culture de méristème provenant de matériel jeune.....	30
2.2. Culture de méristème provenant de matériel adulte.....	31
2.3. Le microgreffage.....	31
3. Les milieux de culture.....	31
3.1. Les substances minérales.....	31
3.2. Les substances organiques.....	32
3.2.1. Les éléments trophiques.....	32
3.2.2. Les éléments oligo-dynamiques.....	32
3.2.3. Autres.....	33
3.3. Les chambres de cultures.....	33
3.4. L'acclimatation.....	34

C. RESULTATS35

I. LA GERMINATION.....35

II. LA CULTURE DE MERISTEME.....36

1. Tests de désinfection des microboutures issues de pieds-mères.....	36
2. Initiation de méristème à partir de matériel adulte.....	36
2.1. Effet de la kinétine combinée à la GA3.....	36
2.2. Effet de la BAP combinée à l'ANA et à la GA3.....	37
3. Initiation de méristème à partir de matériel jeune.....	37
3.1. Milieu d'initiation.....	37
3.2. Microboutures de première subculture.....	38
3.3. Microboutures de deuxième subculture.....	38
4. Enracinement des microboutures de Citrus sinensis (variété locale) issues de matériel jeune.....	38
4.1. Effet de l'ANA et de l'AIB sur l'enracinement.....	38
5. Acclimatation.....	39

III. LE MICROGREFFAGE.....	39
D. DISCUSSION.....	41
I. LA GERMINATION.....	41
II. LA CULTURE DE MERISTEME.....	42
1. Tests de désinfection des microboutures issues de pieds-mères.....	42
2. Effet des balances hormonales sur l'initiation de méristème à partir de matériel adulte.....	42
3. Régénération de plantes entières par la culture de méristème à partir de matériel jeune.....	43
III. LE MICROGREFFAGE.....	44
E. CONCLUSION	46

LISTE DES PLANCHES DU TEXTE

Planche n°1 :

fig. n°1 :

- Localisation des méristèmes primaires.

fig. n°2 :

- Schéma d'un méristème de tige chez une Angiosperme.

(In : Bases de la Multiplication Végétative, Margara, 1984).

fig. n°3

- Schéma d'un méristème d'Oeillet.

(In : La culture *in vitro* et ses applications horticoles, Auge et coll., 1982).

Planche n°2 :

- Pied-mère fournissant le matériel végétal âgé (exemple : *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*).

Planche n°3 :

fig. n°1 :

- Microbouturage d'explants à partir de rameaux du pied-mère.

fig. n°2 :

- Méristèmes avec primordia foliaires après 3 et 9 jours de culture.

Planche n°4 :

- Microboutures de *Citrus sinensis* en phase de subculture I issues de la culture de méristème de matériel végétal jeune.

Planche n°5 :

fig. n°1 :

- Enracinement de pousses à partir de la culture de méristème de *Citrus sinensis* (matériel végétal jeune).

fig. n°2 :

- Plantes issues de la culture de méristème acclimatées en serre.

LISTE DES TABLEAUX DU TEXTE

Tableau n°1 : Clé dichotomique du genre *Citrus* (d'après Swingle).

Tableau n°2 : Composition des milieux de germination et de microbouturage.

Tableau n°3 : Composition des milieux des différentes phases de la culture de méristème.

Tableau n°4 : Effet du type de désinfectant sur la germination après 1 mois de culture.

Tableau n°5 : Effet de la durée de conservation des graines sur la germination.

Tableau n°6 : Taux de reprise des microboutures issues de pieds-mères en fonction du désinfectant.

Tableau n°7 : Effet de la concentration de kinétine combinée à la GA₃ sur l'initiation de méristème.

Tableau n°8 : Effet de la concentration de BAP sur les méristèmes en phase d'initiation.

Tableau n°9 : Appréciation des résultats sur l'initiation de méristème à partir de matériel végétal jeune après 1 mois de culture.

Tableau n°10 : Appréciation de la croissance des pousses en phase de deuxième subculture.

Tableau n°11 : Effet de l'ANA 0.1 μ M et de l'AIB 10 μ M sur l'enracinement des microboutures de deuxième subculture.

Tableau n°12 : Evolution des plantules enracinées au cours de l'acclimatation.

Tableau n°13 : Taux de reprise des microgreffes sur mottes "Mil-Cap".

INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS DU TEXTE

AIA : Acide Bêta Indol Acétique

AIB : Acide Bêta Indol Butyrique

ANA : Acide Naphtalène Acétique

BAP : 6-Benzyl-aminopurine

CDH : Centre pour le Développement de l'Horticulture

2ip : 2isopentényladénine

FeEDTA : Fer Ethylène Diamine Tétra-acétique Acide

GA₃ : Acide gibbérellique

ISRA : Institut Sénégalais de Recherches Agricoles

**ORSTOM : Institut Français de Recherche Scientifique et Technique pour le Développement
en Coopération**

INTRODUCTION GENERALE

Les agrumes représentent la première production fruitière mondiale avec 83 millions de tonnes en 1993 (CIRAD,1995). Les oranges représentent 70 % de cette production. Près de 35 % de la production totale d'agrumes est destinée à la transformation. Les principaux pays producteurs sont le Brésil, les Etats Unis et la Chine. L'étendue de l'aire agrumicole actuelle est également très vaste puisqu'elle se situe approximativement entre les 40° degrés de latitude Nord et Sud, ce qui correspond aux zones climatiques tempérées chaudes et tropicales.

- Au Sénégal, l'activité agrumicole est répartie en deux zones écologiques :
- la Casamance avec les variétés locales dont la production atteint 5 tonnes/hectare.
 - Dakar et Thiès avec les variétés améliorées dont la production atteint 15 à 25 tonnes/hectare en fonction de l'âge des arbres.

Actuellement, la tendance demeure la plantation de variétés améliorées dont le rendement reste de loin le plus élevé avec l'avènement de vergers à grande échelle au détriment des variétés locales.

Globalement, ce sont les orangers qui occupent le sommet de la production avec 60 %, les citronniers, les mandariniers et les pomélos avec respectivement 20 %, 10 %, et 5 % de la production.

L'évolution de la production sur les huit dernières années montre que la plus faible récolte a dépassé les 20.000 tonnes. C'est ainsi que de 23.000 tonnes en 1987, elle est passée à 30.547 tonnes en 1994 avec un pic de 31.000 tonnes en 1989 (Direction de l'horticulture, 1995). Au même moment la production de mangues est passée de 59.660 à 70.170 tonnes et celle de la banane de 4.800 à 6.622 tonnes.

Ces chiffres montrent que les agrumes occupent une part importante dans la production fruitière au Sénégal qui est de l'ordre de 30 %.

Il convient donc de relever le défi de la croissance agricole et de la compétitivité en plantant la qualité afin de récolter plus dans le contexte actuel où le "consommé local" doit s'ériger en règle absolue. La réussite d'une telle entreprise pourrait engendrer des retombées économiques considérables tout en améliorant la qualité nutritive des populations.

Dans un contexte plus global, les sélectionneurs d'espèces horticoles et notamment fruitières mettent l'accent sur l'amélioration quantitative et qualitative des cultivars.

C'est ainsi que pour la transformation, les principaux critères sont la productivité et à un moindre titre les teneurs en jus et en sucre, ainsi que la nature des pigments.

Pour le marché du fruit frais, la qualité demeure le critère essentiel. La définition de la qualité organoleptique peut varier suivant les habitudes du consommateur, mais reste déterminée par l'arôme, la teneur en jus et en sucre, l'acidité élevée ou modérée (Ollitrault & De Rocca Serra, 1992). L'aspermie (absence de pépins), la facilité d'épluchage, la coloration interne et externe participent aussi à la définition de la qualité du fruit. L'étalement de la production constitue également un objectif important des programmes de sélection.

Des caractères de résistance aux maladies sont également recherchés. En Europe, il se développe actuellement un marché important pour les agrumes d'ornement en pot, conduisant à définir de nouveaux critères de sélection comme : un port en boule, plusieurs floraisons par an, des fruits de petits calibres très colorés, ...

Il est intéressant donc pour le sélectionneur de pouvoir assurer la propagation en masse d'une espèce donnée quand celle-ci renferme des caractères recherchés. La propagation des variétés d'agrumes se fait essentiellement par greffage. Mais de nombreuses maladies des agrumes sont transmissibles par ce procédé. Il est donc nécessaire de réaliser une sélection sanitaire ou un assainissement des pieds mères des variétés propagées.

Dans la pratique de la propagation à une échelle semi-industrielle, un objectif essentiel est l'obtention de plants conformes au type initial mais également de matériel sain.

La culture de méristème ou d'apex de tige et le microgreffage *in vitro* assurent dans la plupart des cas, la reconstitution de clones homogènes et assainis.

La culture *in vitro* est un puissant outil pour la production massale d'individus sélectionnés, d'une part par la stimulation de la croissance pendant les phases de culture *in vitro* et d'autre part par la possibilité qu'elle offre de pouvoir étudier au sein d'une population végétale donnée, les génotypes présentant les meilleures potentialités de clonage.

L'existence de maladies à virus dans les vergers d'agrumes est connue depuis assez longtemps. Tous les vergers agrumicoles du monde sont affectés, plus ou moins sévèrement, par ces viroses.

Les symptômes d'affections virales peuvent apparaître sur une ou plusieurs parties de l'arbre, mais les virons sont généralement présents dans la totalité du végétal (Praloran, 1971). Dans ces conditions, toute portion de la plante est susceptible de transmettre, par greffage, le virus à un plant non infecté.

Les viroses des agrumes peuvent être transmises de diverses manières :

- par greffage (toutes les viroses)
- par la graine (Frisolée, Panachure infectieuse, Psorose écailleuse, Exocortis)
- par les insectes vecteurs (Tristeza, Greening, Vein Enation-Woody Gall)
- par la sève (Panachure infectieuse, Frisolée, Rabougrissement des Citranges, Exocortis)

Les conditions de milieu peuvent jouer un rôle important dans l'apparition et l'évolution des symptômes et elles déterminent également la possibilité d'adaptation des insectes vecteurs.

Les arbres porteurs de virus ne peuvent être guéris, aussi convient-il de prévenir ces affections en utilisant uniquement de jeunes plants indemnes en essayant de les maintenir à l'abri des infections, en utilisant des porte-greffe tolérants.

Au Sénégal, les informations recueillies au niveau du Centre pour le Développement de l'Horticulture (C.D.H) ne dénotent pas de l'existence de foyers d'infection précis. La plupart des pertes subies sur les pieds d'agrumes ne sont signalées qu'après la mort des arbres. Il se pose ainsi un problème de diagnostic de la maladie qui a causé la mort des pieds.

Pour circonscrire toute éventualité d'attaque virale, il est demandé à toutes les concessions de disposer au moins d'un pied de citronnier. Cet arbre peut servir de marqueur car il est très sensible à la Tristeza.

Margara (1984), note que la plupart des phénomènes de "dégénérescence clonale" (connues chez la pomme de terre, le fraisier, le framboisier et de très nombreuses plantes multipliées par clones) sont attribuables à des virus latents ou à des mycoplasmes.

Pour remédier à cet inconvénient de la multiplication végétative, on fait appel à la culture de méristème et au microgreffage. Ces deux techniques complémentaires ont le mérite d'associer éventuellement la lutte phytosanitaire à la multiplication.

La présente étude porte sur le clonage de plusieurs espèces du genre *Citrus* par la culture de méristème et le microgreffage *in vitro*.

* La culture de méristème comporte deux volets :

- la régénération de pousses feuillées par la culture de méristème issu de deux types de matériels biologiques.

Le matériel biologique jeune est obtenu à partir de graines germées de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (variété locale).

Le matériel biologique adulte provient de la micropropagation d'explants formés de noeuds axillaires à partir de pieds greffés de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (= Navel Thomson), de *Citrus paradisi* (Macf.) (=Pomélo Shambar), de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (= Lime de Tahiti) et de *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* (Tangor ortanique) étant des variétés améliorées.

- Le deuxième volet porte sur l'enracinement des pousses issues de la culture de méristème.

* Le microgreffage est une technique qui vient en appoint à la culture de méristème. Plusieurs semis de graines de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, de *Citrus grandis* (L.) Osbeck, de *Citrus reticulata* Blanco ont été effectués pour servir de porte-greffe. A partir de ces variétés locales, nous avons effectué des homogreffes et des hétérogreffes suivant l'origine du greffon. Nous avons également étudié l'effet du type de support sur la réussite du microgreffage.

A. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. REGENERATION DE PLANTULES A PARTIR DE LA CULTURE IN VITRO DE MERISTEME.

La culture de méristème ou d'apex de tige a été réalisée dans trois perspectives différentes, fondamentales ou appliquées : 1) l'étude du fonctionnement du méristème; 2) la reconstitution de clones indemnes de virus (et éventuellement de mycoplasmes) à partir de plantes-mères infestées; 3) la propagation végétative avec un taux de multiplication élevé et le risque minimal d'obtention de variants (Margara, 1984).

1) Culture de méristème ou d'apex utilisée comme technique de recherche expérimentale

Dès 1922, Robbins avait essayé, sans grand succès de cultiver des extrémités de tiges et de racines de Pois et de Maïs. La question était de savoir si le méristème possédait une autonomie de croissance et de développement, selon un programme pré-établi; ou si à l'inverse, il était entièrement dépendant de l'action de substances provenant de différents organes de la plante.

Ball (1946), obtint ainsi le premier la régénération de quelques plantes de Lupin et de Capucine à partir d'apex d'assez grandes dimensions. Les premières cultures de points végétatifs (d'environ 150 μm) réalisées avec des Ptéridophytes (*Adiantum*, *Osmunda*, *Selaginella*) par Wetmore et Morel (1949) et par Wetmore (1954) avaient pour but également la recherche des exigences du méristème en culture. Actuellement, la culture de méristème et d'apex caulinaire est toujours utilisée pour l'étude des interactions probablement complexes qui orientent la morphogenèse (Margara, 1984).

2) La culture de méristème ou d'apex en vue de la multiplication végétative

Morel et Martin (1952, 1955) ont été les premiers à obtenir la régénération de plantes saines (de *Dahlia* et de Pomme de terre) à partir de clones infestés par des maladies à virus. Ils mettaient ainsi en évidence l'aptitude des points végétatifs à la régénération de plantes entières, cette aptitude apparaissant comme une propriété générale des plantes supérieures et non une aptitude particulière limitée aux Ptéridophytes. Ils apportaient également la preuve expérimentale de l'aptitude des tissus méristématiques à demeurer pratiquement indemnes de virus dans le contexte d'un environnement tissulaire infesté.

Morel (1960) obtint des protocormes d'Orchidées à partir de culture d'apex et une multiplication végétative précoce *in vitro* avec un taux élevé de propagation. Dès lors les méthodes de multiplication traditionnelle des Orchidées étaient bouleversées. En effet, le méristème de *Cymbidium*, séparé de la plante-mère et cultivé *in vitro* régénère un protocorme, structure développée normalement par l'embryon. Le protocorme est un petit

tubercule organique, capable de produire de nombreux points végétatifs adventifs, lesquels pouvant former de nouveaux protocormes ou évoluer en pousses feuillées.

Par ailleurs ces observations suggèrent que la technique de multiplication *in vitro* à un stade précoce avec un taux de propagation élevé, pouvait probablement être étendue à de nombreuses espèces.

Une autre étape dans l'histoire de la multiplication par culture d'apex a été précisément la mise au point de techniques favorisant la prolifération de méristèmes axillaires ou adventifs et permettant de réaliser la propagation avec un taux élevé de multiplication chez des espèces diverses. C'est ainsi que Hackett et Anderson (1967), Adams (1972) et Boxus (1974) obtinrent la prolifération de bourgeons axillaires à partir de culture d'apex respectivement sur l'Oeillet et le Fraisier.

La culture de méristème ou d'apex de tige demeure la méthode de multiplication *in vitro* la plus aisément généralisable comme la plus sûre pour l'obtention de "copies conformes" exemptes de "variations" indésirables (Margara, 1984).

3) La culture de méristème et la reconstitution de clones sains

La production et la distribution de matériel végétal sain est devenue à nos jours une nécessité surtout dans l'optique des systèmes intensifs de monoculture. Cette situation s'est amplifiée avec l'expansion des techniques rapides de multiplication végétative et le transit de plants à l'échelle internationale.

A part les contaminations superficielles, les plantes peuvent être infectées par des pathogènes. Ceux-ci peuvent affecter la vigueur de la plante ainsi que sa production et sa qualité.

Dans le cas des organismes latents, De Fossard (1977), note qu'ils peuvent compromettre la multiplication de plusieurs espèces, notamment *in vitro* en réduisant la vigueur et le taux de prolifération, en induisant des pertes énormes suite à leur apparition lors des stades successifs de micropropagation. Il faut y ajouter toutes les conséquences qu'entraîne ce type d'inconvénient quant à la réputation des producteurs des plants.

Kartha (1981), rapporte que 10 % des virus connus sont transmis via les semences des plantes infestées.

Des organismes latents, mais non pathogènes dans les lieux de production des plants, peuvent devenir pathogènes sous d'autres environnements (Perombelou, 1980).

Il est à signaler que si la production de matériel végétal indemne de maladies est recherchée, dans certaines situations, les plantes infectées par certains virus peuvent présenter une certaine résistance aux infections par d'autres virus ou champignons redoutés comme cela a été rapporté chez la Pomme de terre.

Dans d'autres cas, la présence de virus, de mycoplasmes ou d'autres champignons est recherchée par les sélectionneurs de fleurs intéressés par la couleur de leur produit (variégation) (George et Sherrington, 1984).

Lors de ces travaux sur la culture *in vitro* de racines de tomates White (1934), avait réussi à cultiver des racines infestées par le virus de la mosaïque du Tabac (VMT). En repiquant des fragments de racine d'une longueur d'environ 1 mm, proches de l'extrémité apicale, il obtenait des souches indemnes de virus.

Limasset et Cornuet (1949), utilisant la méthode sérologique, retrouvèrent avec la tige, le gradient de concentration déjà observé dans la racine et conclurent que le méristème des plantes infestées était pratiquement dépourvu de virus.

Morel et Martin (1952, 1955) prouvèrent expérimentalement que l'on pouvait effectivement régénérer des clones sains à partir de plantes infestées dans les deux exemples du Dahlia et de la Pomme de terre.

De nombreuses applications de la culture de méristèmes à des fins d'assainissement ont été rapportées chez les espèces fruitières telles que le Pommier, l'Abricotier, le Pêcher, le Figuier, le Bananier et les *Citrus* (Boxus et Druart, 1986). Il est à noter que l'élimination des virus par la culture de méristème ne confère pas une immunité à la plante.

Une autre méthode d'élimination des pathogènes demeure la thermothérapie, méthode reposant sur un traitement par la chaleur (traitement prolongé à des températures de l'ordre de 37°C ou traitement bref à 50°C). C'est une méthode utilisée seule ou en association avec la culture de méristème. La thermothérapie vise à éliminer les micro-organismes thermosensibles et des espèces comme la canne à sucre ont été débarrassées de certains mycoplasmes par traitement thermique (Morel et Martin, 1968).

Cependant de nombreux virus résistent au choc thermique dont l'intensité de surcroît est forcément limitée au degré de résistance de la plante.

L'utilisation des viricides en culture de tissu a été testée par plusieurs auteurs. Hansens et Lane (1983) ont pu inhiber le CLSV (Chlorotic Leaf Spot Virus) chez les méristèmes du Pommier mis en culture en présence du Ribavin=virazol (agent antiviral).

4) Autres applications de la culture de méristème

Cette technique pourrait être plus largement associée au stockage au froid pour la conservation de matériel (cryoconservation) et faciliter ainsi l'échange international de clones sans virus.

La création d'une "banque de plantes guéries" avait été proposée par Martin dès 1954 (Martin, 1980).

La cryoconservation permet également de garder des espèces à hautes valeurs commerciales ou des espèces en voie de disparition.

La multiplication végétative à partir d'arbres âgés ayant déjà exprimé leurs potentialités (arbres fruitiers, forestiers) pose de nombreuses difficultés liées à la maturation des méristèmes. Cependant tous les méristèmes ne sont pas sur un même arbre à un niveau identique de maturation. Ainsi la culture de méristèmes latents demeurés juvéniles, par la possibilité qu'elle offre de miniaturiser l'explant, de le libérer des corrélations inhibitrices existant au niveau de l'arbre, induit des modifications morphologiques et physiologiques caractéristiques de rajeunissement. Plusieurs espèces des genres : *Citrus*, *Prunus*, *Pinus*, *Sequoia*, *Eucalyptus*, ont été rajeunies par la culture de méristème.

5) Le microgreffage

Une technique complémentaire à la culture de méristème, demeure le microgreffage *in vitro*. En effet chez les espèces ligneuses, il se pose un problème de réactivation du méristème excisé et d'enracinement des microboutures obtenues par la culture de méristème.

Murashige et al., (1972) développèrent cette technique chez les *Citrus* consistant à microgreffer des apex isolés à partir de plantes infestées sur des porte-greffe exempts de virus et obtenus à partir de graines germées *in vitro*. Cette méthode a été utilisée avec succès chez les *Citrus* (Navarro et coll., 1975), le Pêcher (Alskieff, 1977), le Pommier (Alskieff et Villemur, 1980).

Les progrès réalisés ont fait que le microgreffage a constitué le pilier du programme adopté en Espagne à partir de 1975 pour l'amélioration des variétés de *Citrus*.

5.1. Facteurs affectant la réussite du microgreffage

Plusieurs facteurs affectent la réussite du microgreffage.

5.1.1. Facteurs liés au porte-greffe

Dans le cas des *Citrus* par exemple, la germination des graines est réalisée à l'obscurité étant donné que la lumière a été rapportée affectant la réussite du microgreffage (Navarro et al., 1975).

Concernant l'âge des porte-greffe, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le Citrange troyer étioilé et âgé de 12 jours (Navarro et al., 1975) et avec le *Poncirus trifoliata* âgé de 3 jours, mais élevé à la lumière (Mosella et al., 1979).

Les cotylédons sont éliminés, les racines et épicotyles réduits respectivement à environ 4-6 cm et 1.5 cm de long (Navarro et al., 1975).

5.1.2 Facteurs liés au greffon

La réussite du microgreffage est corrélée positivement à la taille des greffons utilisés. Ainsi, le taux de réussite a varié de 1.8 à 4.7 % chez les *Citrus* (Navarro et al., 1975) et de 15 à 90 % chez *Malus* (Huang et Millican, 1980) quand la taille des greffons a augmenté de 0.05 à 0.8 mm en incluant davantage de primordia foliaires.

Pour éviter les risques de contamination par les virus, des greffons composés du dôme méristématique accompagné de 3 primordia foliaires, mesurant 0.14 à 0.18 mm, sont généralement utilisés dans les travaux d'assainissement des *Citrus* (Navarro et al., 1975).

Le prétraitement des greffons par incubation à l'obscurité pendant 5 jours et à 5000 ergs/cm/s pendant 2 jours chez les agrumes a été rapporté bénéfique (Jonard et al., 1987).

L'utilisation de nouvelles pousses a permis d'obtenir de meilleurs résultats.

5.1.3. Facteurs liés à la technique de greffage

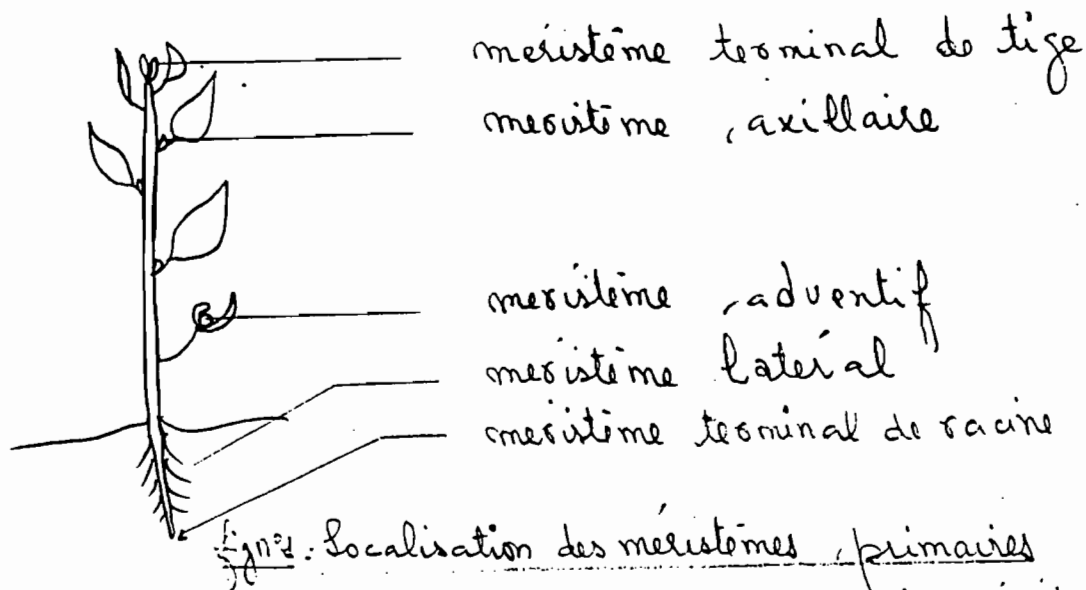
Les meilleurs résultats sont obtenus quand l'emplacement du greffon se fait sur l'anneau vasculaire ou en incision en "T" renversé sur le cortex (Navarro et al., 1975). Ces deux méthodes ont également abouti à des résultats similaires (40 à 50 %) chez le pêcher (Negueroles et Jones, 1979).

5.1.4. Autres facteurs

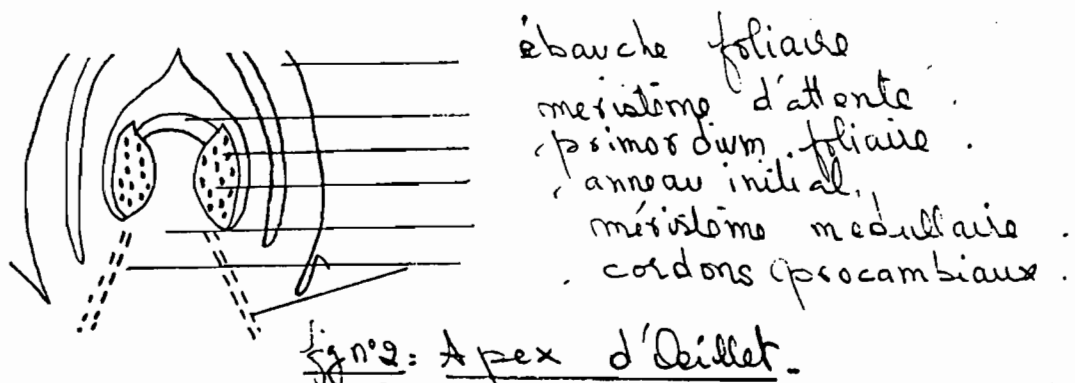
Afin d'améliorer le taux de réussite, des prétraitements des greffons et/ou des porte-greffe ont été essayés. Les explants sont trempés dans une solution hormonale avant le microgreffage de même que des applications externes de régulateurs de croissance et/ou d'antioxydants après le greffage ont été testés (Alskieff et Gautheret, 1977; Martinez et al., 1979; Mosella et al., 1979; Jonard et al., 1983; Starrantino et Carusu, 1987).

Souvent le milieu avec un pont de papier filtre comme support est utilisé tout comme la vermiculite assurant une meilleure oxygénation.

Le milieu solidifié par l'agar entraîné une asphyxie racinaire et un développement des racines secondaires.



(In: Bases de la multiplication végétative, Margalea 1984)



(In: La Culture in vitro et ses applications horticoles, R. Auge et coll.)

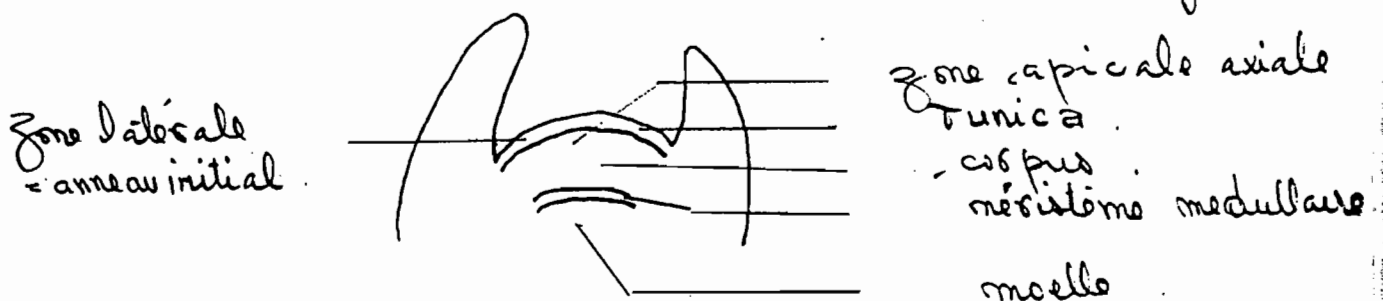


PLANCHE n°1 figⁿ 3, schéma d'un meristème de tige, chez une Angiosperme

(In: Bases de la multiplication végétative, Margalea, 1984)

Chez les *Citrus*, le saccharose à 85 g/l améliore le pourcentage de réussite du microgreffage qui augmente de 40 % avec le contenu normal (30-50 g/l) à 95 % (Mapouya, 1983) (cité par Bones et Druart, 1986).

II. ETUDE DES FACTEURS LIES A LA CULTURE DE MERISTEME

1) Structure anatomique du méristème de tige

Les méristèmes sont des massifs de cellules dont certaines se divisent activement et qui mettent en place des tissus ou des organes. Les méristèmes primaires (de tige ou de racine) sont organogènes. Les méristèmes secondaires (cambium, assise génératrice subérophellodermique) comme les méristèmes intercalaires (de la tige des Graminées, de la hampe florale du Nénuphar,...) sont seulement histogènes.

Dans les conditions naturelles, sur la plante entière, les méristèmes primaires de tige peuvent être : terminal (ou apical), axillaire (axillé par une feuille ou une bractée), adventif (formé sur un entre-noeud de tige, une feuille, une racine,...) (planche n°1, fig. n°1).

Les méristèmes de tige formés *in vitro* sur un cal peuvent être considérés comme un cas particulier de méristèmes adventifs. Il vaut mieux les appeler méristèmes de néoformation (Margara, 1984). Dans la pratique de la multiplication végétative, il est essentiel de garder toujours présent à l'esprit la distinction entre les différentes catégories de méristèmes caulinaires pouvant présenter des caractéristiques physiologiques différentes. Ainsi, note Margara (1984), seuls les méristèmes axillaires ou les méristèmes adventifs formés spontanément sont des "formations naturelles".

Chez les plantes vasculaires, la forme et la structure des méristèmes caulinaires sont très variables selon les espèces. Cependant, les principales différences sont observées surtout en trois grands types de structure correspondant respectivement aux Cryptogames vasculaires, aux Gymnospermes, et aux Angiospermes.

Chez une Prêle ou une Fougère, on observe une grosse cellule terminale, la cellule initiale qui fournirait les autres cellules du méristème par divisions dans plusieurs plans.

Chez une Gymnosperme, on observe dans la région apicale des files cellulaires radiales. Il n'y a donc plus une cellule initiale mais un ensemble de cellules initiales (Clowes, 1961).

Chez les Angiospermes, les dimensions tout comme la morphologie et la structure du méristème sont variables. Cependant cette diversité n'exclut pas un certain nombre de caractéristiques communes (planche n°1, fig. n°2-3).

Depuis les travaux de Schnidt (1924), on fait souvent la distinction entre la tunica composée de quelques couches cellulaires externes et le corpus profond. La différence essentielle entre ces deux régions concerne le plan des divisions, perpendiculaire à la surface dans la tunica, en tous sens dans le corpus.

La structure du méristème a suscité beaucoup de controverses. Foster (1938) distinguait plusieurs zones dans le méristème de *Ginkgo biloba*, tandis que Popham (1951) décrivait dans l'ensemble des plantes vasculaires 7 classes de méristèmes.

A la suite des travaux de Plantefol (1948), de Buvat (1955), de Nougariède (1965) et de nombreux autres auteurs, on distingue généralement dans le méristème d'Angiosperme une zone apicale axiale, ayant une activité mitotique et une synthèse de RNA souvent réduite, une zone latérale, "l'anneau initial" (selon Plantefol) qui met en place les ébauches foliaires. Le méristème médullaire est constitué par des cellules plus proches du type cambial et produit la moelle.

En schématisant, la phase végétative serait caractérisée par le fonctionnement actif de l'anneau initial produisant les feuilles tandis que la zone apicale ("méristème d'attente" selon Buvat, 1955) serait activée lors du passage à la phase reproductrice et jouerait alors le rôle essentiel dans la mise en place de l'inflorescence.

2) Taille des explants

Les méristèmes mesurent approximativement 0.1 mm de diamètre et 0.25 à 0.3 mm de longueur (Kantha, 1981).

Des dimensions non standardisées sont utilisées par divers auteurs pour désigner la culture de méristème.

Broome et Zimmerman (1984) par exemple, utilisent la terminologie de méristème apical pour désigner des explants d'espèces fruitières pouvant atteindre jusqu'à 1 mm.

Pour Margara (1984), des explants de 1mm ne doivent plus être considérés comme des "méristèmes", mais comme des apex.

En conséquence il serait intéressant de préciser, pour une espèce donnée, le nombre d'ébauches foliaires accompagnant le dôme méristématique lors de la description des explants utilisés en culture de méristème.

La régénération est d'autant plus facile que l'explant est de grande taille. Cependant, dans un but phytosanitaire, le nombre de plants indemnes de virus est inversement proportionnel à la taille des méristèmes.

Navarro et Juarez (1977) ont pu obtenir un taux de réussite de 100 % chez les *Citrus* en utilisant des méristèmes de 0.10 à 0.15 mm ayant un maximum de "deux" primordia foliaires.

Kassanis et Varma (1967) obtinrent chez la pomme de terre 95 % de plants indemnes des virus PVX (Potato Virus X) et PVS (Potato Virus S) en utilisant des méristèmes de 0.1 mm de long avec ou sans primordia foliaires.

Avec des tailles pareilles, ces auteurs n'ont réussi à avoir que 10 % de régénération.

3) Milieu de culture

La production de plants via la culture de méristème est généralement réalisée par une initiation des méristèmes *in vitro* (stade I), suivie par la prolifération de pousses (stade II) et leur enracinement (stade III). Non seulement la composition du milieu de culture utilisé est fonction de l'espèce, mais également elle varie d'un stade de culture à un autre.

Le milieu initial utilisé par Morel et Martin (1955) était le milieu de KNOP, dilué de moitié, additionné de microéléments, de glucose (4 %), de vitamines à faible concentration et d'ANA (0.001 mg/l).

* Pour Pennazio et Redolfi (1974), l'adjonction de gibbérelline au milieu permet une augmentation de reprise de 49 % par rapport au témoin sur milieu liquide.

Schnabdrauch et Sink (1979) estimèrent que les gibbérellines, étant donné qu'elles sont synthétisées en quantités suffisantes par la plupart des explants, ne sont généralement utilisées que pour stimuler l'élongation des bourgeons.

Hu et Wang (1983) ont rapporté que cette hormone n'a été utilisée que dans très peu de cas et à de faibles concentrations (inférieures ou égales à 0.29 μM).

Omura et Hidaka (1992) obtinrent le meilleur rendement au stade I avec 50 μM de GA₃ en travaillant sur différentes variétés du genre *Citrus*.

Morel et Muller (1964) ont montré l'intérêt d'un apport de gibbérelline, laquelle dans ces conditions, semble agir au niveau du fonctionnement de "l'anneau initial", site d'initiation des ébauches foliaires.

* Etant de petite taille, les méristèmes mis en culture ne semblent pas avoir suffisamment de cytokinines endogènes pour supporter leur croissance et leur développement au cours de leur établissement *in vitro* (stade I). Pour cette raison la plupart des milieux d'initiation contiennent une cytokinine.

La BAP reste la plus utilisée chez plusieurs espèces, suivie par la kinétine (Nair et al., 1979). La 2ip et la zéatine n'ont été utilisées que dans très peu de cas à cause de leur prix élevé et de leur disponibilité limitée.

Il est à noter qu'une cytokinine donnée, jugée efficace pour la culture de méristème de certaines espèces, peut ne pas l'être avec d'autres.

* Egalement les méristèmes (taille inférieure ou égale à 0.4 mm) peuvent ne pas produire ou contenir des niveaux suffisants d'auxine endogène pour supporter la croissance des pousses, d'où la nécessité d'ajouter dans le milieu de culture une auxine exogène

L'ANA (0.045-10 μM) (correspondant respectivement à 8.37 $\mu\text{g/l}$ et 1.86 mg/l), reste l'auxine la plus utilisée chez plusieurs espèces. Elle est suivie par l'AIB et l'AIA (Hu et Wang, 1983).

* Les méristèmes se développent bien sur un milieu solidifié par l'agar (0.6-0.8 %). Cependant le milieu liquide reste préférable dans le cas où les explants libèrent des produits phénoliques ou des pigments.

Il est recommandé de réduire les concentrations d'hormones normalement utilisées en milieux semi solides étant donné que sous ces conditions, leur assimilation se trouve accélérée (Karthi, 1984).

* Afin de réduire davantage l'oxydation des tissus et des milieux de culture, un prétraitement des explants par des antioxydants ou leur addition aux milieux de culture sont des pratiques courantes chez les espèces riches en produits phénoliques.

Pillai et Hildebrandt (1968), dans le cas du *Pelargonium*, observent qu'une période obscure est nécessaire pour limiter la production de polyphénols.

Huth et Bode (1970) pratiquent la culture des méristèmes de pomme de terre à l'obscurité afin de réduire l'activité auxine oxydasique.

* Pour le pH, un niveau compris entre 5.6 et 5.8 semble être adéquat pour la culture de méristèmes de la plupart des espèces (Karthi, 1981).

Actuellement, le milieu de Murashige et Skoog (1962) modifié reste le plus utilisé avec le plus de succès pour la culture des méristèmes de plusieurs espèces (Hu et Wang, 1983). Cependant, les concentrations optimales des différentes composantes du milieu, en particulier des macroéléments restent à déterminer.

4) Condition d'incubation

Les tubes à hémolyse (1.2 x 10 cm) restent les conteneurs les plus utilisés.

Chez de nombreuses espèces, les résultats obtenus montrent que les petits conteneurs sont meilleurs que ceux de grandes dimensions (Trainier, 1965).

En général, l'incubation est faite à une température constante comprise entre 20 et 28°C et sous une photopériode de 16 heures et une lumière de 1000 - 10000 lux.

Des intensités lumineuses faibles (<100 lux) ou un prétraitement à l'obscurité sont indiqués pour les espèces riches en composés phénoliques.

5) Epoque de prélèvement des explants

Elle est importante à considérer pour la réussite de la culture de méristème.

Stone (1963), note chez l'Oeillet que les meilleurs résultats sont obtenus quand les explants sont prélevés au début du printemps et en automne.

Chez la plupart des variétés de pomme de terre, le printemps et le début de l'été semblent être les périodes les plus favorables pour l'établissement des méristèmes (Mellor et Stace-Smith, 1969).

Une alternative pour surmonter le problème d'établissement lié à l'époque de prélèvement des méristèmes demeure l'utilisation d'explants issus *in vitro*.

6) Enracinement des explants

Une bouture feuillée ou un apex caulinaire mis en culture *in vitro* possède déjà au moins un méristème caulinaire. Mais quelle que soit la méthode de propagation végétative employée, le matériel utilisé doit toujours être apte à la néoformation de racines.

Les méristèmes de racine se répartissent en plusieurs catégories, selon leur origine.

- a) Les méristèmes latéraux de la racine principale sont formés d'une manière "spontanée" dans les conditions naturelles.
- b) Les méristèmes adventifs sont produits par des organes divers (tige, tubercule, bulbe, feuille,...) soit spontanément, soit accidentellement à la suite d'une blessure, plus souvent d'une manière provoquée, dans les conditions du bouturage et du marcottage.
- c) Les méristèmes néoformés au sein d'un cal, en culture *in vitro*, peuvent être considérés comme un cas particulier de méristèmes adventifs (Margara, 1984).

La néoformation des méristèmes de racine (comme celle d'ailleurs des méristèmes de tige) résulte toujours d'une dédifférenciation cellulaire poussée qui aboutit à la production de cellules méristématiques primaires et à l'organisation d'une ébauche méristématique (Margara, 1984).

Les massifs constitués par ces cellules méristématiques primaires très différenciées ne présentent à l'origine aucune structuration définie. Mais il semble que le plus souvent la détermination de territoires inorganisés en "champs morphogénétiques à vocation rhizogène" s'effectue précocement. Cependant, dans l'exemple bien connu du Cresson (*Nasturtium officinale*, étudié par Champagnat et coll., 1967) il existe à l'aisselle des feuilles des zones méristématiques indéterminées capables d'évoluer en racine ou bourgeon selon le régulateur de croissance (auxine ou cytokinine) utilisé comme "effecteur".

Les racines ont généralement une origine profonde : à proximité des faisceaux vasculaires même si dans certains cas particuliers, les racines adventives sont initiées à partir de tissus superficiels parfois épidermiques (*Crassula multicaulis*, *Cardamine pratensis*, *Nasturtium officinale*) (Favre, 1977).

6.1. Auxine et enracinement

L'enracinement des pousses issues de multiplication végétative par culture *in vitro* ne pose généralement pas de problème lorsqu'il s'agit de plantes annuelles. Il n'en va pas de même avec les plantes ligneuses dont l'enracinement *in vitro* et *ex vitro* reste aléatoire (Kevers et coll., 1990).

La formation de racines adventives et leur développement ultérieur en un système racinaire fonctionnel et vigoureux est nécessaire au sevrage des cultures (Monteuuis et Bon, 1985).

Le rôle central de l'auxine dans le déclenchement hormonal de la rhizogenèse est suggéré à la fois par les applications d'auxine exogène et par le dosage d'hormone.

L'application d'AIA stimule fréquemment l'enracinement des boutures (Margara, 1984). Cependant Gaspar et Coumans (1987) ont pu établir que l'apport d'auxines synthétiques (ANA, AIB, 2,4-D) est généralement plus efficace que celui de l'auxine naturelle (AIA) pour l'induction racinaire, l'AIA étant photosensible et rapidement métabolisé dans la plante.

Le dosage de l'auxine endogène à la suite d'extractions et des tests biologiques confirme le rôle de l'auxine sur la rhizogenèse. Le taux d'auxine peut s'accroître en relation avec la néoformation de racines (Vardjan et Nitsch, 1961). De même, l'auxine peut s'accumuler aux noeuds qui s'enracinent souvent de manière préférentielle (Kulesha, 1952).

L'absence d'enracinement adventif chez certaines microboutures a souvent été attribuée à un niveau auxinique endogène trop faible.

Sané (1994), travaillant sur *Accacia raddiana* montre que l'enracinement des boutures de deuxième subculture nécessite d'abord un milieu contenant une auxine ou une combinaison auxine-cytokinine, puis un milieu sans auxine.

Cependant Biran et Halevy (1973), ont pensé que le niveau auxinique n'est pas un facteur limitant.

C'est ainsi que Sauton et al. (1982), et Barlass et Skene (1982 b) ont pu obtenir un enracinement sans apport auxinique en travaillant sur *Citrus sinensis* x *Poncirus*.

Omura et Hidaka (1992), notent que l'addition au milieu d'enracinement d'AIB ou d'ANA permet l'enracinement de cinq cultivars de *Citrus* alors que seules deux variétés ont été enracinées en absence d'auxine.

6.2. Autres facteurs de l'enracinement

Il paraît actuellement évident que l'auxine n'est pas l'unique facteur de rhizogenèse. Après ablation des racines néoformées une seconde application est alors sans effet. De même dans certains cas, l'application d'auxine reste sans effet.

A la suite de nombreuses expériences, en particulier sur des fragments d'*Impatiens balsamina*, Bouillenne (1964), a formulé le concept de "complexe rhizocalinique" qui comporterait au moins trois éléments : 1- un facteur inconnu mobile synthétisé dans les feuilles à la lumière et migrant, d'une manière polarisée, 2- l'auxine, 3- un facteur cellulaire existant seulement dans certaines cellules et réalisant la fixation et la

combinaison des deux premiers. Cette réaction ferait partie d'un métabolisme oxydatif aérobie.

* Les composés phénoliques regroupent un très grand nombre de constituants aussi variés que les tanins, les anthocyanes, les lignines, les flavonoïdes, les acides phénoliques et dérivés de la coumarine (Cauvin et Masson, 1992).

Quant à leur action sur l'enracinement des plantes en particulier des espèces ligneuses, les avis restent partagés.

Jones et Hatfield (1976), puis James et Thurbon (1979) (cités par Berthon, 1990) ont montré successivement chez le Pommier et le Framboisier que l'apport de phloroglucinol en synergie avec l'auxine dans le milieu de culture, augmente l'enracinement.

Chez *Eucalyptus grandis*, Herman et al., (1992) (cités par Cauvin et Masson, 1992) ont mis en évidence une présence importante de composés phénoliques qui inhibent l'enracinement, mais que l'utilisation d'antioxydants (acide borique, acide ascorbique) peut améliorer.

Chez *Sequoiadendron giganteum*, Berthon (1990), a montré en testant plusieurs composés phénoliques, sur trois clones d'âges différents, que leur influence sur l'enracinement varie avec la plante, la période de traitement ainsi que la nature et la concentration du composé phénolique.

* Les peroxydases sont des enzymes extrêmement répandues chez les végétaux. Il s'agit d'apoenzymes (glycoprotéines) associées à un groupement prosthétique (ferri-porphyrrique).

Des auteurs ont pu observer des fluctuations de l'activité peroxydasique notamment chez le *Prunus* (Quoirin et al., 1980), *Nicotiana* (Gaspar et al., 1990), *Sequoiadendron* (Berthon, 1990). Parfois l'analyse de ces fluctuations a été couplée avec une analyse de variation du profil isoenzymatique (Moncousin, 1982; Moncousin et Gaspar, 1983; Berthon, 1990). Ces auteurs ont pu observer le processus d'enracinement en deux phases : la phase d'induction durant laquelle l'activité peroxydasique atteint un maximum et la phase d'initiation au cours de laquelle cette activité décroît.

Tableau n° 1

TABEAU IV
CLÉ DICHOTOMIQUE DU GENRE CITRUS (d'après Swingle)

Poils vésiculaires à rares postréolles d'huile, avec dernière n'étant jamais libre. Pétiole peu ou pas ailé ou, si largement ailé, à nœuds subcordiformes et jamais plus larges que les 3/4 du limbe. Fleurs généralement grosses et parfumées (2,5 à 4,5 cm de diamètre) étamines soudées. Sous-genre <i>Eucitrus</i>.	Fruits à 6 à 8 segments, parfumés, jaunes à maturité, jus amer rendant le fruit incommestible. Pétiole court à très petites ailes. Fleurs petites (1,2 à 1,5 cm de diamètre) ...		<i>Citrus nobilis</i> (Mak.) Tan.	
	Pétiole non ailé, soudé au limbe ou imparfaitement articulé avec lui. Fleurs parfaites ou souvent mâles par avortement de l'ovaire. Gros fruits à peau épaisse ...		<i>Citrus medica</i> Linn. (cedrus).	
	Fruits à nombreux segments (9 à 14, rarement 15 à 18). Pulpe acide, douce ou légèrement amère. Fleurs grosses (généralement 2,5 à 4,5 cm de diamètre).		<i>Citrus limon</i> (Linn.) Sw. (Citron).	
	Pétiole ailé, nettement articulé avec le limbe.		<i>Citrus reticulata</i> Blanco (Mandarine et Tangerine).	
	Étamines en nombre généralement supérieur à 4 fois celui des pétales. Fleurs parfaites et mâles par avortement de l'ovaire. Pétiole faiblement ailé.		<i>Citrus indica</i> Tan.	
	Fruits à peau non adhérente se détachant facilement des segments.		<i>Citrus grandis</i> (Linn.) Osbeck (Pamplemousse).	
	Étamines généralement en nombre quadruple des pétales. Fleurs généralement parfaites. Pétiole largement ou faiblement ailé.		<i>Citrus aurantium</i> (Linn.) Osbeck (Oranger).	
	Fruits à peau adhérente, graines non vertes intérieurement.		<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Nainglé (Lime).	
	Poils vésiculaires sous-croisés de nombreuses postréolles d'huile libre. Pétiole long et très largement ailé, mais non cordiforme, ailes souvent presque aussi larges que le limbe. Étamines généralement libres.		<i>Citrus ichangensis</i> (Sw.) Tan.	
	Graines acuminées ou soudées, graines rares, grosses, courtes, épaisses et anguleuses.		<i>Citrus latipes</i> (Huang.) Tan.	
Poils vésiculaires sous-croisés de nombreuses postréolles d'huile libre. Pétiole long et très largement ailé, mais non cordiforme, ailes souvent presque aussi larges que le limbe. Étamines généralement libres. Sous-genre <i>Papedio</i>.	Fleurs très petites (1,2 à 1,5 cm de diamètre ou moins encore). Fruits à peu de segments (6 à 9).		<i>Citrus microcarpa</i> (Wen.)	
	Fleurs de taille moyenne (1,5 à 2 cm de diamètre) étamines toutes libres.		<i>Citrus celebica</i> (Huang.)	
	Fruits à 15 à 20 segments.		<i>Citrus macrocarpa</i> (Wen.)	
	Fruits à 10 à 14 segments.		<i>Citrus hystrix</i> (Linn.)	
	Pétiole ailé à bords subentiers. Fruits globuleux, lisses.		<i>Citrus aurantium</i> (Linn.) (Oranger).	
	Pétiole ailé à bords crénelés ou dentés. Fruits irréguliers, obtus à une ou aux deux extrémités.		<i>Citrus aurantium</i> (Linn.) (Oranger).	
	Écorce orange lisse, pulpe douce, pétiole faiblement ailé.		<i>Citrus aurantium</i> (Linn.) (Oranger).	
	Écorce orange écarlate brillante, rugueuse, pulpe très acide plus ou moins amère, pétiole assez largement ailé.		<i>Citrus aurantium</i> (Linn.) (Oranger).	
	Fruits très gros (11 à 17 cm de diamètre). Poils vésiculaires généralement aisément séparables, pétioles largement ailés, subcordés. Graines grosses, habituellement aplatis, jaunâtres, rugueuses, généralement à un seul embryon.		<i>Citrus aurantium</i> (Linn.) (Oranger).	
	Fruits gros (9 à 13 cm de diamètre), poils vésiculaires plus gros, soudés entre eux, pétiole assez largement ailé, mais non subcordé. Graines assez fines, blanches, polyembryonnaires.		<i>Citrus aurantium</i> (Linn.) (Oranger).	

B. MATERIELS ET METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

1) La plante

Le mot "agrumes" est un nom collectif, (masculin pluriel), désignant les seules espèces utilitaires du genre *Citrus* et de deux genres voisins (*Fortunella* et *Poncirus*). Il s'applique aussi bien aux arbres qu'à leurs fruits (Praloran, 1971).

Nous avons essentiellement travaillé sur différentes espèces du genre *Citrus*.

1.1. Position systématique

Ordre : Géraniales

Famille : Rutacées

Tribu : Citreae

Sous-tribu : Citrineae

Genre : *Citrus*

espèces : *sinensis*, *grandis*, *limon*, *reticulata*, *paradisi*, *aurantifolia*, *reticulata* x *sinensis*

Comme matériel biologique jeune, nous avons travaillé sur les espèces locales suivantes :

- Citrus sinensis* (L.) Osbeck ,
- Citrus grandis* (L.) Osbeck,
- Citrus limon* (L.) Burm. F.,
- Citrus reticulata* Blanco.

Le matériel adulte comprend les variétés améliorées suivantes :

- Citrus sinensis* (L.) Osbeck (=Navel Thomson)
- Citrus paradisi* (Macf.) (=Pomélo Shambar)
- Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (=Lime de Tahiti)
- Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* (Tangor Ortanique).

Il faut noter cependant que le genre *Citrus* est celui pour lequel, le problème de classification se pose avec le plus d'acuité. Le nombre des espèces et variétés de validité botanique certaine, l'appartenance de certaines variétés à telle ou telle espèce donnent lieu à discussion entre spécialistes de la taxonomie des agrumes.

C'est ainsi que Chapot (1955) estime que les espèces *Citrus indica* et *Citrus tachibana* décrites par Swingle (1948), sont douteuses, que *Citrus medica* dérive probablement de *Citrus limon* dont elle serait une forme tératologique, que *Citrus paradisi* a une validité incertaine et représente plutôt une mutation ou un hybride de *Citrus grandis*. Enfin, il pense qu'une certaine confusion règne dans l'espèce *Citrus aurantifolia* à laquelle de nombreuses variétés sont rattachées sans raisons suffisantes.

On voit donc que la taxonomie du genre *Citrus* n'est pas simple. Cependant les travaux de Swingle (1948) font autorité en la matière et fournissent une base suffisante pour une approche de cette question (Tableau n°1).

1.2. Caractères botaniques

Les caractères distinctifs généraux du genre *Citrus* sont décrits de la manière suivante :

- Petits arbres dont les jeunes rameaux deviennent très rapidement cylindriques, épineux (épines à l'aisselle des feuilles), mais dont les branches âgées sont fréquemment inermes.
- Feuilles à une foliole, habituellement minces, non coriaces, dont les veines principales sont peu nombreuses, le réseau de veines secondaires ne sort pas sur le limbe.
- Les fleurs apparaissent à l'aisselle des feuilles, elles sont solitaires ou en petites grappes corymbiformes, parfaites ou mâles par avortement plus ou moins du pistil.
- Le fruit est formé de segments contenant les graines placées dans l'angle intérieur, le reste de l'espace est rempli de poils vésiculeux pédonculés, fusiformes, composés de grosses cellules à contenu très aqueux. Les segments sont entourés d'un endocarpe blanc à l'extérieur duquel est une écorce à très nombreuses glandes à essence, devenant jaune ou orange à maturité.
- Les graines sont obovales ou obovales aplaties, plus ou moins anguleuses. Elles contiennent un ou plusieurs embryons blancs ou verts.

* *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (= variété locale)

Outre les variétés blondes "fines", on classe aussi dans ce groupe les "communes", qui sont souvent multipliées par semis. Ce sont des variétés vigoureuses, productives, épineuses, à fruits spermés et à chair habituellement grossière.

* *Citrus reticulata* Blanco (= mandarine commune)

Le fruit est de forme sphérique, aplati aux deux pôles. La peau fine, non adhérente, est lisse et colorée en "jaune-orange" à maturité. L'axe est creux, la pulpe orange clair, est juteuse, tendre, très agréablement parfumée avec de nombreux pépins.

* *Citrus limon* (L.) Burm. F.

Le fruit, de forme généralement ovale, se termine par un mamelon caractéristique. La peau adhère assez fortement aux quartiers. La pulpe acide, de texture fine, est colorée en jaune pâle.

* *Citrus grandis* (L.) Osbeck

Plusieurs auteurs considèrent que le pomélo n'est qu'une sous-espèce ou une variété botanique du *Citrus grandis*.

Les pamplemoussiers se distinguent principalement des pomélos par les caractères suivants :

- jeunes rameaux et pétioles pubescents,
- axe creux,
- pulpe ferme et croquante,
- fruit volumineux,
- saveur très variable,
- pépins monoembryonnés

* *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (= Navel Thomson)

Les oranges navels se différencient des autres par deux caractéristiques bien distinctes au moins :

- présence au sein de l'apex d'un petit fruit rudimentaire appelé "navel";
- aspermie très marquée du fait de la non viabilité de la plupart des ovules et de l'absence de pollen fonctionnel.

La variété "Thomson" est une mutation plus précoce et à peau lisse de "washington" mais moins juteuse et perdant plus rapidement ses qualités.

* *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (= Lime de Tahiti)

Le fruit, de la taille d'un petit citron, est asperme. La pulpe a les caractéristiques de celle des limes à petits fruits bien qu'elle soit légèrement moins acide et moins parfumée.

* *Citrus paradisi* (Macf.) (= Pomélo Shambar)

C'est la seule espèce d'agrumes qui ne soit pas originaire du Sud-Est asiatique, puisqu'elle est apparue aux Antilles.

Cette espèce provient très certainement d'une mutation de bourgeon ou d'une hybridation du pamplemousse. La variété "shambar" est une mutation de bourgeon de "Marsh" une autre variété asperme et à pulpe blonde. Elle serait plus précoce, meilleure et plus colorée que le "Redblush", toutes deux à pulpe sanguine.

* *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* (= Tangor ortanique)

Les tangors sont des hybrides entre mandarinier et oranger. De nombreuses variétés dont l'origine est inconnue, telles que "Ortanique", "King", "Temple"... sont supposées être des tangors naturels. Dans le cas qui nous concerne, l'hybridation est faite entre la clémentine et l'oranger hamlin

1.3. Ecologie

La seule limite à la diffusion des agrumes dans le monde a été le facteur climatique et singulièrement la présence de froids suffisants à les détruire.

Il est évident que les conditions écologiques sous lesquelles ces espèces fruitières sont cultivées varient généralement, depuis celles régnant dans les zones tropicales humides jusqu'à celles caractérisant les régions semi-arides ou arides.

De ce fait, chaque facteur écologique se manifeste très différemment d'un lieu de culture à l'autre et n'acquiert une importance agronomique que dans certaines aires culturelles.

L'extension remarquable des agrumes, très à l'extérieur de leur aire d'origine (Sud-Est asiatique, d'après Tanaka, 1933), démontre leur faculté d'adaptation à des climats très divers. Malgré leur caractère mésophytique, marqué, selon Webber (1948), par leurs feuilles larges, l'absence de mécanismes et de dispositifs limitant la transpiration et l'évaporation, le faible développement du chevelu, le manque presque total de protection du bourgeon par des écailles, et enfin, l'absence d'une période régulière de dormance, les agrumes peuvent être cultivés avec succès sous des climats très chauds et très secs et dans des régions à hiver relativement froid.

Il est surprenant, à priori, de voir combien l'aire actuelle de culture industrielle des agrumes s'est étendue hors des limites de la zone d'origine de ces essences et combien les conditions de climat y sont variées.

Webber, (1948) note que l'habitat naturel d'une plante ne constitue pas toujours une indication fidèle des conditions optimales de son développement. Son lieu d'origine et la

compétition avec les autres plantes locales peuvent l'avoir forcé à occuper un territoire où elle ne peut atteindre son développement optimum.

Il est certain que, pour les agrumes, et dans les limites des qualités recherchées par l'homme, les zones actuelles de culture possèdent des avantages sur celles d'origine. Et Hume, (1957) de souligner : "Si leur climat topical permet d'obtenir de bonnes limes et de bons pomélos, il est douteux que la consommation d'oranges ait pu atteindre une telle importance si ces fruits étaient ceux insipides, insuffisamment acides et peu colorés, produits par les orangers sous climat tropical".

Plus de 50 % des agrumes cultivés le sont sous un climat estival aride, alors que le territoire d'origine connaît les pluies de mousson d'été qui atteignent et dépassent même souvent 1200 mm par an, tandis que ces zones à climat estival aride ont une pluviosité annuelle souvent inférieure à 1000 mm.

Notons qu'il existe à l'intérieur de l'aire des agrumes, une zone optimale pour chaque espèce ou variété. Dans celle-ci la qualité du fruit, la résistance et la longévité de l'arbre sont à leur maximum. Lorsqu'on s'en éloigne, la coloration du fruit ou sa saveur s'en trouvent altérées, l'arbre devient plus sensible aux maladies, le développement végétatif lui-même peut être affecté. Les irrigations, la combinaison de porte-greffe et de greffons constituent des palliatifs utilisables, mais dans certains cas insuffisants.

Les progrès techniques considérables de ces dernières années, et particulièrement la sélection de matériel végétal exempt de viroses connues ou tolérant à celles-ci, constituent des possibilités de réussites nouvelles, même parfois dans les régions périphériques.

2) Provenance du matériel végétal

Les graines des différentes espèces de *Citrus* utilisées pour les germinations proviennent de fruits achetés sur le marché.

Les plantes greffées en serre nous sont gracieusement cédées par le Centre pour le Développement de l'Horticulture (C.D.H, km 15, route de Rufisque).

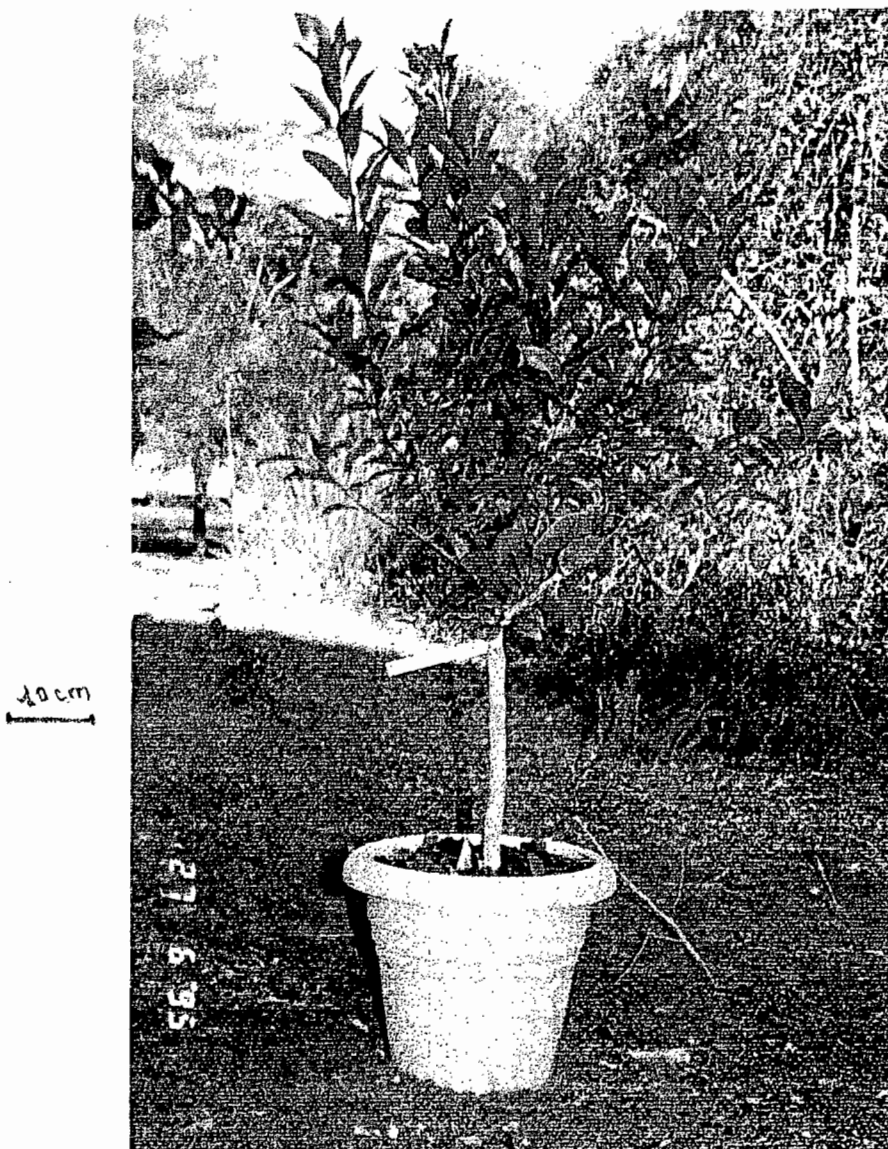


Planche n°2 : Pied-mère fournissant le matériel végétal âgé : exemple du *Citrus reticulata*
x *Citrus sinensis*

II. LES CONDITIONS DE CULTURE

1) Préparation du matériel biologique

Deux types de matériels biologiques sont utilisés au cours de nos expériences :

- un matériel jeune obtenu après semis de graines de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus limon* (L.) Burm. F. et *Citrus grandis* (L.) Osbeck.
- un matériel adulte obtenu à partir de plantes en serre. Ce sont des pieds greffés de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Navel Thomson), de *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle (=Lime de Tahiti), de *Citrus paradisi* (Macf.) (= Pomélo Shambar) et de *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* (Tangor ortanique). Les greffons proviennent de pieds dont la moyenne d'âge est de 4 ans.

1.1. Préparation du matériel jeune

Ce chapitre concerne essentiellement le volet germination des graines, matériel végétal utilisé dans la culture de méristème et le microgreffage. Les premiers essais de germination *in vitro* ont porté sur des graines non décortiquées de *Citrus reticulata*. Par la suite, les graines de toutes les espèces sont décortiquées à l'exception de celles de *Citrus limon* dont les lobes cotylédonnaires se détachent après décortication. Pour ces dernières, plusieurs incisions sont faites sur le tégument avant le semis.

Le protocole de désinfection étant le même, toutes les graines sont d'abord lavées à l'eau déminéralisée avec quelques gouttes de Teepol (agent mouillant) puis rincées à l'eau distillée stérile. Ensuite, commence la désinfection proprement dite avec une solution d'hypochlorite de calcium à 7 % ou du chlorure mercurique à 1 g/l. Au bout de 30 mn, les graines sont rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile. Ces différentes opérations se passent sous la hotte à flux laminaire.

Parallèlement au type de désinfectant, l'effet du temps de conservation des graines sur la germination a été également recherché.

Les graines sont ensuite prégermées dans des bocaux contenant de l'eau gélosée.

1.2. Préparation du matériel adulte

Le matériel adulte (planche n°2) maintenu en serre subit régulièrement des traitements phytosanitaires.

L'arrosage à l'Aliette (1 g/l) et au Benlate (0.7 g/l) pour éviter les attaques fongiques de même que des pulvérisations et épandages d'insecticides comme le Decis et le Temik G ont été effectués.

Si les fongicides s'attaquent aux champignons qui infectent la plante, les insecticides s'attaquent aux insectes souvent vecteurs d'agents pathogènes.

Compte tenu de la petitesse des pieds qui pose un problème à générer un nombre important de bourgeons, nous avons pensé à faire du microbouturage *in vitro* dans le but d'assurer une prolifération de bourgeons et partant un nombre suffisant de méristèmes. Les explants portant 1 à 2 noeuds axillaires sont prélevés des rameaux de la plante-mère. Il sont d'abord lavés abondamment à l'eau de robinet, puis trempés pendant 1 à 2 mn à l'alcool 70°.

Plusieurs tests de désinfection sont réalisés dans le but de minimiser le taux de contamination. Nous avons successivement utilisé une solution d'hypochlorite de calcium à

Tableau n°3 : Composition des milieux des différentes phases de la culture de meristème

	Initiation 1	Initiation 2	Subculture	Enracinement
*Macroéléments de Murashige et Skoog (1962)				
KNO ₃		1 900		
NH ₄ NO ₃		1 650		
CaCl ₂ , 2H ₂ O		440		
MgSO ₄ , 7H ₂ O		370		
KH ₂ PO ₄		170		
Microéléments de Murashige et Skoog (1962)				
KI		0.83		
MnSO ₄ , 4H ₂ O		22.3		
ZnSO ₄ , 7H ₂ O		8.6		
H ₃ BO ₃		6.2		
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O		0.25		
CuSO ₄ , 5H ₂ O		0.025		
CoCl ₂ , 6H ₂ O		0.025		
Vitamines mg/l	*NN (1965)	MS (1962)		
Myoinositol	100		100	
Thiamine-HCl	0.5		0.1	
Acide nicotinique	5		0.5	
Pyridoxine-HCl	0.5		0.5	
Biotine	0.05		-	
Acide folique	0.5		-	
Vitamine B ₁₂	0.2 mg/l		-	
FeSO ₄		27.8		
EDTA		37.3		
Saccharose		30 g/l		
Hormones mg/l				
Kinéline	0/0.21/2.15/10.16	-		
ANA	-	0.019	0.019	Milieu ANA 0.019
BAP	-	0.22	0.22	-
AIB	-	-	-	Milieu AIB 2.03
² GA ₃	17.32	17.32	1.73	-
pH		5.7		
Gelrite g/l		2		
Hydrolysate de caséine	11.16	-		

* Les macroéléments de MS (1962) sont dilués de moitié dans le milieu de culture initiation1

* NN=Nitsch et Nitsch

* La GA₃ étant thermolabile, elle est ajoutée au milieu de culture déjà autoclavé par filtration stérilisante

7 % pendant 30 mn, le chlorure mercurique à 1 g/l de solution pour un temps égal, puis la même solution d'hypochlorite de calcium pendant 30 mn suivie de rinçages à l'eau distillée stérile avant un trempage dans du chlorure mercurique à 1 g/l pendant 10 mn.

2) La multiplication végétative

Le clonage d'une espèce peut se faire par différentes façons. Nous avons utilisé la culture de méristème et le microgreffage comme exemples de micropropagations.

NB : La composition des différents milieux de culture utilisés lors de nos expérimentations figurent dans les tableaux n° 2 et 3.

2.1. Culture de méristème provenant de matériel jeune

A la sortie de la radicule et de la tigelle des graines prégermées de *Citrus sinensis*, les jeunes plants sont transférés dans des bocaux contenant une solution minérale à base des éléments minéraux de Murashige & Skoog (1962) en vue de leur croissance (Tableau n°2).

* Les méristèmes apicaux de ces plants présentant deux primordia foliaires sont alors excisés sous la loupe binoculaire à l'aide d'instruments très fins. Cette phase ne comprend aucune désinfection, car les opérations de semis étaient menées dans des conditions aseptiques. Ces méristèmes à deux primordia foliaires ainsi excisés sont alors introduits dans des tubes à essai contenant un milieu nutritif (Tableau n°3).

Deux séries d'expériences sont alors menées en l'espace d'une semaine suivant les mêmes conditions de culture. Nous les avons finalement confondues en une seule, car la reprise de croissance des méristèmes était presque synchrone et les explants provenant du même semis.

Au total 83 méristèmes ont été mis en culture sur un milieu MS (1962) d'initiation contenant de l'ANA 0.1 μ M (0.019 mg/l), de la BAP 1 μ M (0.22 mg/l) et de la GA₃ 50 μ M (17.32 mg/l).

* Après un mois de culture, les microboutures obtenues par la reprise de croissance des méristèmes subissent une première subculture. Les explants mesurent environ 1 cm et comprennent des apex et des noeuds axillaires (Tableau n°3).

* Une deuxième subculture a lieu au bout d'un mois dans les mêmes conditions. Les explants sont issus de la première subculture et tous les 15 jours, la croissance et le nombre de tiges sont mesurés durant un mois.

Les milieux de subcultures ne diffèrent du milieu d'initiation que par la dose de GA₃ qui passe de 50 μ M (17.32 mg/l) à 5 μ M (1.73 mg/l).

* Après la phase de subculture II, les explants mesurant environ 1 cm sont cultivés sur deux milieux d'enracinement. Au milieu MS (1962) de base, nous avons ajouté de l'ANA 0.1 μ M (0.019 mg/l) pour le premier milieu et de l'AIB 10 μ M (2.03 mg/l) pour le second milieu d'enracinement (Tableau n°3).

0,5 cm

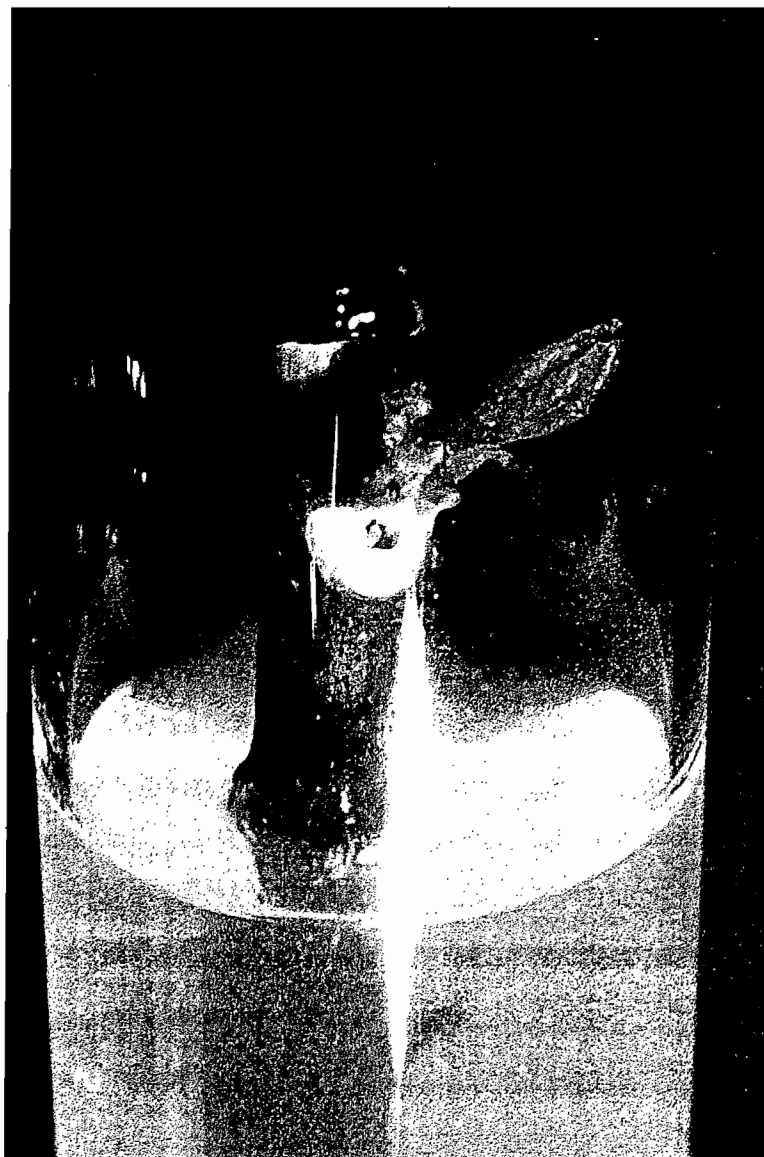
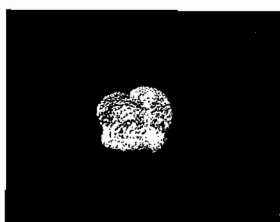


Planche n° 3 : fig. n°1 : Microbouturage d'explants à partir de rameaux du pied-mère

1 mm



1 mm

Planche n°3 : fig. n°2 : Méristèmes avec primordia foliaires après 3 et 9 jours de culture

2.2. Culture de méristème provenant de matériel végétal adulte

La micropropagation des explants formés de 1 à 2 noeuds issus du matériel adulte se fait sur le milieu de Murashige et Tucker (1969) (Tableau n°2).

La durée de la mise en culture est variable, les méristèmes apicaux de ce bourgeonnement axillaire sont prélevés après 5 à 15 jours de mise en culture. Ils présentent deux primordia foliaires et l'initiation se fait sur deux gammes de milieux en faisant varier les doses de kinétine et de BAP (planche n°3, fig. n°1-2).

Au total, l'initiation de méristème à partir de matériel végétal adulte a été testée sur 7 milieux de culture.

2.3. Le microgreffage

Les semis de graines utilisés pour le microgreffage *in vitro* proviennent des espèces suivantes : *Citrus sinensis*, *Citrus grandis*, *Citrus reticulata*. Après la prégermination, les jeunes plants sont transférés dans des bocaux avec un milieu MS (1962) quand le greffage se fait avec un pont de papier filtre comme support. Ce pont est percé d'un trou au milieu pour faire passer les racines du porte-greffe.

Si le support est une motte "Mil-Cap", les prégerminations sont directement transférées dans les tubes à essai contenant un milieu MS (1962) imbibant la motte. La motte "Mil-Cap" est un assemblage fibreux de forme cylindrique. Elle absorbe facilement le liquide et se laisse traverser par les racines.

Pour le microgreffage, l'obtention de graines germées et la croissance des porte-greffe se passe à l'obscurité pour avoir un étiolement.

Après une dizaine de jours d'étiolement des plants obtenus à partir de semis, les cotylédons sont éliminés, les racines et épicotyles réduits respectivement à environ 4-5 cm et 2 cm de long lorsque le support est un pont de papier de filtre. Le méristème apical du porte-greffe est alors excisé et déposé sur la surface de coupe de l'épicotyle le plus proche du cambium dans le cas d'une homogreffe.

S'il s'agit d'une hétérogreffe, le greffon est un méristème issu de matériel végétal âgé obtenu après microbouturage d'explants à partir des rameaux du pied-mère.

Dans le cas des mottes "Mil-Cap", les racines ne sont pas réduites car les prégerminations y sont directement transférées.

Rappelons que dans les deux types de supports, le milieu de culture est celui de Murashige et Skoog (1962).

3) Les milieux de culture

Ils varient suivant le type d'explant et selon le but visé. Divers milieux de base comprenant des sels minéraux, des composés organiques et des régulateurs de croissance ont été testés.

3.1. Les substances minérales

Nous avons choisi comme milieu de base les macroéléments et les microéléments de Murashige & Skoog (1962), pour tous nos milieux de culture (Tableau n°2).

Le fer est sous forme chélaté, c'est à dire FeEDTA (5.57 g de FeSO₄ et 7.45 g de EDTA) à raison de 5 ml/l de milieu.

3.2. Les substances organiques

La culture de tissus et d'organes *in vitro*, exige un apport de substances organiques. En effet, ces cultures sont largement hétérotrophes vis à vis du carbone de par l'absence de photosynthèse.

Les substances organiques sont constituées d'éléments trophiques d'une part et de composés oligo-dynamiques d'autre part.

3.2.1. Les éléments trophiques

Sources de carbone, ces composés sont indispensables dans les milieux de culture. L'apport de glucides n'a pas exclusivement pour objet d'optimiser la croissance des tissus, il peut également orienter l'organogenèse, le manque de sucre étant souvent un facteur limitant.

Nous avons utilisé au cours de nos expériences diverses quantités de sucre en fonction du but visé :

- 20 g/l de saccharose dans le milieu MS de base servant à la croissance des graines prégermés en vue de la culture de méristème et du microgreffage.
- 50 g/l de saccharose dans le milieu de Murashige & Tucker (1969) servant pour la micropropagation à partir de noeuds axillaires issus du matériel végétal âgé.
- 30 g/l de saccharose dans les milieux MS d'initiation, de subcultures et d'enracinement d'explants à partir de la culture de méristème.

3.2.2. Les éléments oligo-dynamiques

* Les vitamines

Diverses vitamines favorisent la croissance des tissus en culture; et il n'est pas exclu que le manque de certaines d'entre elles puisse être un facteur limitant de phénomènes d'organogenèse. Cependant, la seule vitamine dont on signale un effet net est la thiamine, apportée généralement à une concentration variant de 0.1 à 1 mg/l. Dans certains cas, des apports plus importants (50 à 100 mg/l) sont effectués avant autoclavage. Il ne peut alors être exclu qu'une part de l'activité observée soit attribuable à des produits de dégradation.

Nous avons utilisé trois mélanges vitaminiques : les vitamines de Murashige & Skoog (1962), de Murashige & Tucker (1969), de Nitsch & Nitsch (1965) dont les compositions sont données dans les tableaux n°2 et 3.

Dans le milieu d'initiation avec kinétine, nous avons ajouté de la vitamine B12 (= cyanocobalamine) à raison de 0.2 mg/l et de l'hydrolysate de caséine à raison de 80 mM (11.16 g/l). Le milieu avec kinétine concerne uniquement la culture de méristème à partir de matériel végétal âgé.

Au milieu de Murashige & Tucker (1969) de micropropagation d'explants issus de matériel végétal âgé, nous avons ajouté de la glycine à raison de 2 mg/l.

* Les hormones

Les régulateurs de croissance naturels de végétaux sont appelés phytohormones. Indépendamment des substances naturelles, de nombreux régulateurs de croissance de synthèse peuvent être utilisés en culture *in vitro*.

Nous nous sommes intéressés aux auxines, aux cytokinines et aux gibbérellines.

Les auxines sont responsables de la prolifération cellulaire et de l'enracinement.

Les cytokinines favorisent la multiplication cellulaire.

Les gibbérellines jouent un rôle dans l'allongement des entre-nœuds.

Nous avons testé plusieurs concentrations de BAP et de kinétine lors de l'initiation de méristème à partir de la micropropagation d'explants issus de matériel végétal adulte.

Les concentrations de ANA et de GA₃ sont respectivement de 0.1 μ M (0.019 mg/l) et 50 μ M (17.32 mg/l) dans les milieux d'initiation avec BAP (Tableau n°3).

Dans les milieux avec kinétine il n'y a que de la GA₃ comme autre source hormonale avec une concentration de 50 μ M (17.32 mg/l) (Tableau n°3).

Pendant les phases de subcultures, seule la concentration de GA₃ change par rapport au milieu d'initiation en passant de 50 μ M (17.32 mg/l) à 5 μ M (1.73 mg/l) (Tableau n°3).

La BAP et l'ANA ont été également utilisés respectivement aux concentrations de 5 mg/l et 1 mg/l dans le milieu de Murashige & Tucker (1969) de microbouturage.

Dans la phase d'enracinement des explants provenant de la culture de méristème à partir de matériel végétal jeune, nous avons testé l'effet de l'ANA 0.1 μ M et de l'AIB 10 μ M doses équivalentes respectivement à 0.019 mg/l et 2.03 mg/l (Tableau n°3).

NB : La GA₃ étant thermolabile, elle est ajoutée aux milieux de culture déjà autoclavés après filtration stérilisante à 0.2 micromètre sous la hotte.

3.2.3. Autres

Deux agents gélifiants ont été utilisés au cours de nos expériences:

- la gelrite ou phytigel à 2 g/l pour les différentes phases de la culture de méristème.
- le Bacto Agar Difco :
 - à 6 g/l dans l'eau gélosée utilisée lors des prégerminations
 - à 7 g/l pour la croissance des graines prégermées
 - à 8 g/l pour le bouturage des explants venant de serre

Le pH des milieux est ajusté à 5.7, le milieu de culture est préchauffé au four à micro-ondes ou à l'autoclave (110°C pendant 5 mn) pour faire fondre l'agent gélifiant avant la distribution en bocaux ou en tubes.

Les milieux sont distribués à l'aide d'un distributeur automatique (Jouan PM 600) puis autoclavés à 110°C pendant 20 mn.

Pour les différentes phases de la culture de méristème et du microgreffage, le volume de milieu dans les tubes à essai (20 mm x 150 mm) est de 10 ml.

Dans les tubes contenant le milieu MT (1969) pour la micropropagation par culture de nœuds axillaires provenant des pieds-mères, le volume est de 18 ml.

Il est de 50 ml dans les bocaux (500 ml) contenant le milieu de croissance des graines prégermées.

3.3. Les chambres de cultures

Les principaux facteurs de l'environnement climatique des cultures *in vitro* sont : la température, la lumière et l'état hygrométrique.

- La thermopériode est maintenue à 30/27 $\pm$ 0.25°C (jour/nuit).
- La photopériode est de 16 heures le jour. L'éclairement est assuré par des tubes fluorescents (L 58 W) fournissant une intensité lumineuse d'environ 25 à 80 μ E s⁻¹ m⁻².

Un apport d'éclairage en rouge lointain est assuré par des ampoules à filaments de tungstène. Cette source lumineuse permet de compléter le spectre de lumière des tubes fluorescents. L'ensemble de la source lumineuse étant fixe, les cultures sont maintenues sur un dispositif tournant à une vitesse régulière, ce qui fait que les explants reçoivent la même intensité lumineuse.

- L'état hygrométrique dans la chambre de culture est maintenu à $60 \% \pm 5 \%$ le jour comme la nuit par des brumisateurs (Bionaire 8T-201) afin de réaliser l'équilibre dans les échanges entre conteneurs utilisés et la chambre de culture. Il est à noter cependant que généralement, l'obturation des récipients de culture assure une humidification suffisante de l'atmosphère ambiante.

La germination des graines pour l'obtention de porte-greffe se fait à l'obscurité. Il a été rapporté que la lumière affecte la réussite du microgreffage (Navarro et al., 1975).

3.4. L'acclimatation

Les vitroplants enracinés sont sortis des tubes et repiqués dans des pots contenant un mélange de tourbe et de sol stérile. Les pots sont placés dans des mini-serres en atmosphère confinée (100 % d'humidité relative), le tout étant maintenu à l'intérieur d'une pépinière ombragée.

Au bout de quelques jours, l'hygrométrie relative de l'air est progressivement diminuée en ouvrant les volets des mini-serres jusqu'à atteindre les conditions naturelles en enlevant totalement le couvercle des mini-serres.

Tableau n°4 : Effet du type de désinfectant sur la germination après 1 mois de culture

Espèces	Nombre de graines semées	Désinfectant	Nombre de graines polluées	Taux de germination
<i>Citrus sinensis</i>	74	Hypochlorite de calcium 7% pendant 30 mn	27	55.32%
<i>Citrus limon</i>	91		54	83.78%
<i>Citrus grandis</i>	58		0	58.62%
<i>Citrus sinensis</i>	67	Chlorure mercurique à 1 g/l pendant 30 mn	0	0%
<i>Citrus limon</i>	78		16	12.82%
<i>Citrus grandis</i>	57		0	26.31%

Tableau : n°5 Effet de la durée de conservation des graines sur la germination

Espèces	Nombre de graines semées	Nombre de graines polluées	Taux de germination en %	Temps de conservation des graines (jours)
<i>Citrus sinensis</i>	85	7	65.38	10-15
<i>Citrus reticulata</i>	114	51	73.01	
<i>Citrus sinensis</i>	122	32	77.77	
<i>Citrus sinensis</i>	150	33	53.84	30
<i>Citrus sinensis</i>	156	53	41.74	150
<i>Citrus sinensis</i>	98	17	4.9	270
<i>Citrus grandis</i>	117	14	6.19	

NB : La désinfection est faite avec de l'hypochlorite de calcium 7% pendant 30 mn.

C. RESULTATS

I. LA GERMINATION

Les premiers tests de semis ont porté sur des graines de *Citrus reticulata* non décortiquées.

Au bout de 25 jours de culture, une seule graine a germé sur les 68 semées. Après ce premier test, toutes les graines à faire germer sont soit décortiquées soit incisées.

Les graines de *Citrus limon* font exception, la décortication entraînant une séparation des cotylédons. A la place de la décortication, plusieurs incisions sont faites sur l'enveloppe des graines de *Citrus limon*.

Le temps à faire germer les graines a ainsi baissé de plus de 20 jours avec l'absence du tégument par rapport aux graines laissées intactes. Globalement, les premières graines germées apparaissent après 3 à 10 jours de mise en culture. Les graines tardent ainsi à germer par la présence de leur enveloppe. En effet, l'imbibition, le gonflement des graines et la déchirure des parois sont autant de mécanismes qui précèdent la sortie de la radicule et de la tigelle et que peut retarder la présence de l'enveloppe.

Le taux de graines ayant germé étudié sous l'angle du désinfectant a donné les résultats qui figurent sur le tableau n°4.

La désinfection au chlorure mercurique à 1 g/l pendant 30 mn reste assez bonne. Nous n'avons pas enregistré de contamination avec les graines de *Citrus sinensis* et celles de *Citrus grandis*, alors que chez *Citrus limon* il y'a eu 20.15 % de graines contaminées. Cependant, le taux de germination est fortement réduit allant de 0 % pour les graines de *Citrus sinensis* à 26.31 % chez *Citrus grandis*. Il se pourrait donc que le chlorure mercurique présente une nocivité sur l'intégralité des tissus de la graine surtout au niveau de l'embryon.

Le taux de contamination est relativement élevé avec l'hypochlorite de calcium 7 % pendant 30 mn. Il est de 36.48 % chez *Citrus sinensis* et de 59.34 % chez *Citrus limon*, alors qu'il y'a absence totale de d'infection chez *Citrus grandis*. Les graines de *Citrus grandis* semblent être faciles à désinfecter avec un taux de contamination de 0 à 12 % pour l'ensemble des semis effectués. Elles semblent résister mieux à l'attaque des micro-organismes pathogènes surtout fongiques. La facilité à désinfecter ces graines peut s'expliquer également par le fait que les fruits de *Citrus grandis* achetés sur le marché étaient nettement mieux conservés que les autres fruits dont les semences ont été également utilisées au cours de nos manipulations.

Le taux de graines germées quand la désinfection est faite avec l'hypochlorite de calcium 7 % pendant 30 mn est meilleur que dans le premier cas allant de 55.32 % à 83.78 % respectivement chez *Citrus sinensis* et *Citrus limon*.

Tous les semis sont issus de graines dont les fruits ont été achetés sur le marché. Le taux de graines germées a été étudié sous l'angle du temps de conservation des graines (tableau n°5).

Les résultats montrent que les graines conservées au bout de 9 mois perdent nettement leur capacité germinative. Dans le cas par exemple des graines de *Citrus sinensis*, ce taux passe de 65.38 % à 4.9 % après 9 mois de conservation. En se desséchant donc, les graines de *Citrus* perdent en même temps leur pouvoir à germer. Ce comportement diffère du phénomène de dormance qui est un état physiologique réversible.

Tableau n°6 : Taux de reprise des microboutures issues de pieds-mères en fonction du désinfectant

		<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>	<i>Citrus paradisi</i>	<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i>
Hypochlorite de Ca 7% pendant 30 mn	Pollution	24/24 100%	24/24 100%	24/24 100%	8/24 33,33%
	Reprise	---	---	---	12/16 75%
HgCl 1g/l pendant 30 mn	Pollution	47/181 25,96%	8/43 18,60%	54/67 80,59%	83/123 67,47%
	Reprise	59/134 44,02%	24/35 68,57%	13/13 100%	23/31 74,19%
Hypochlorite de Ca 7% pendant 30 mn + HgCl 1g/l pendant 10 mn	Pollution	8/96 8,33%	5/72 6,94%	13/48 27,08%	7/132 5,3%
	Reprise	88/88 100%	57/67 85,07%	35/35 100%	121/125 96,8%

Tableau n°7 : Effet de la concentration de kinétine sur les méristèmes en phase d'initiation^y

Cultivars	Taux de survie en % sur le milieu avec concentration de kinétine (μM) ^x							
	0		1		10		50	
<i>Citrus sinensis</i>	0/24	0%	0/24	0%	0/24	0%	0/24	0%
<i>Citrus paradisi</i>	0/24	0%	0/24	0%	0/24	0%	0/24	0%
<i>Citrus aurantifolia</i>	0/24	0%	0/24	0%	0/24	0%	0/24	0%
<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i>	0/24	0%	0/48	0%	0/24	0%	0/24	0%

^y Les méristèmes sont cultivés sur un milieu MS (1962) complété avec de la GA3 50 μM (17.32 mg/l)

^x Taux de survie après 1 mois de culture pour un total de 24 explants pour chaque cultivar (exception faite de *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* avec kinétine 1 μM avec un effectif de 48 méristèmes)

II. LA CULTURE DE MERISTEME

1) Tests de désinfection des microboutures issues de pieds-mères

Trois protocoles de désinfection ont été initiés comme précédemment décrits. Les résultats figurent sur le tableau n°6.

La forte contamination lorsque les explants sont désinfectés avec de l'hypochlorite de calcium à 7 % pendant 30 mn, montre que ce test ne permet pas d'obtenir des explants axéniques. Elle est de 100 % avec les boutures de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantifolia* et *Citrus paradisi*. Chez *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* le taux de contamination est de 33.33 %. Cependant, nous avons noté que pour les quatre types d'espèces, la plupart des explants avaient déjà repris une croissance en donnant de nouvelles pousses. Ceci laisse supposer que le désinfectant n'a pas eu d'effet nocif sur les tissus des boutures, ce qui nous a valu un fort taux de reprise malgré la forte contamination relevée.

La désinfection au chlorure mercurique à 1 g/l pendant 30 mn a donné des taux de graines contaminées variables allant de 18.60 % chez *Citrus aurantifolia* à 80.59 % chez *Citrus paradisi*. Ces résultats montrent que le taux de contamination reste toujours élevé.

Lorsque la désinfection est faite avec de l'hypochlorite de calcium à 7 % pendant 30 mn suivie d'une deuxième désinfection par le chlorure mercurique à 1 g/l pendant 10 mn, le taux de contamination est nettement plus faible, alors que la reprise de croissance reste assez bonne. Le plus fort taux de contamination est de 27.08 % avec les microboutures de *Citrus paradisi*, devenant plus faible chez *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* avec un taux d'infection de 5.3 %. Parallèlement, la reprise de croissance des explants reste assez satisfaisante avec des taux de 85.07 % chez *Citrus aurantifolia* à 100 % chez *Citrus sinensis*.

A l'issue de ces trois tests de désinfection, nous avons constaté qu'il n'a pas été aisé de trouver une combinaison à même d'assurer une bonne aseptie du matériel végétal âgé. Nous avons procédé à plusieurs reprises à des traitements anti-fongiques et d'insecticides sur les plantes-mères. La période de mise en culture des explants ayant coïncidé avec la saison des pluies il se pourrait que cette période favorable à l'éclosion des micro-organismes pathogènes ait accentué le degré de contamination des pieds-mères.

2) Initiation de méristème à partir de matériel adulte

2.1. Effet de la kinétine combinée à la GA₃

Des doses de 0 μ M, 1 μ M (0.21 mg/l), 10 μ M (2.15 mg/l) et 50 μ M (10.76 mg/l) de kinétine ajoutées à de la GA₃ 50 μ M (17.32 mg/l) ont été testées pour les quatre types d'espèces de *Citrus* avec comme milieu de base celui de Murashige et Skoog (1962). Si nous avons noté un retard au dessèchement dans les gammes témoins et 1 μ M (0.21 mg/l) de kinétine, par contre les milieux avec 10 μ M (2.15 mg/l) et 50 μ M (10.62 mg/l) de kinétine présentent des méristèmes qui se dessèchent très rapidement. Plus de 400 méristèmes provenant des quatre espèces ont été testés (Tableau n°7). Au total, nous n'avons pas pu obtenir des méristèmes viables après quelques jours de culture.

Tableau n°8 : Effet de la concentration de BAP sur les méristèmes en phase de d'initiation

Cultivar	Taux de survie en % sur le milieu avec concentration de BAP (μM) ^x		
	0	1	10
<i>Citrus sinensis</i>	44/48 91.66	43/53 74.13	0/48 0
<i>Citrus paradisi</i>	-	24/48 50	0/48 0
<i>Citrus aurantifolia</i>	43/45 95.55	44/48 91.66	0/48 0
<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i>	44/48 91.66	33/47 70.21	0/48 0

^y Les méristèmes sont cultivés sur un milieu MS (1962) complémenté avec de la GA3 (50 μM) et de l'ANA (0.1 μM)

^x Taux de survie après 3 mois de culture pour un total de 58 explants pour chaque cultivar (exception faite de *Citrus sinensis* avec BAP (1 μM) dont l'effectif est de 60 méristèmes mis en culture)

Tableau n°9 : Appréciation des résultats sur l'initiation de méristème à partir de matériel végétal jeune après un mois de culture

Méristèmes de <i>Citrus sinensis</i> (variété locale) ^x		
Nombre d'explants mis en culture	Taux de survie	Taux de reprise
83	74/83 89.15 %	50/83 60.24 %

^x Les méristèmes sont cultivés sur un milieu MS (1962) complémenté avec de la BAP (1 μM), de l'ANA (0.1 μM), de la GA3 (50 μM)

2.2. Effet de la BAP combinée à l'ANA et à la GA₃

Ici le milieu de base reste celui de Murashige & Skoog (1962). Nous disposons d'un milieu témoin sans BAP mais renfermant de l'ANA et de la GA₃ à des doses constantes, respectivement 0.1 μ M (0.019 mg/l) et 50 μ M (17.32 mg/l). Les deux autres milieux sont identiques pour toutes les composantes exceptée la BAP avec des concentrations de 0.22 mg/l et 2.25 mg/l équivalentes respectivement à 1 μ M et 10 μ M.

Les différentes concentrations de BAP : 0 μ M, 1 μ M (0.22 mg/l), 10 μ M (2.25 mg/l), n'ont pas permis de déclencher une croissance méristématique, capable de régénérer des explants pour la subculture, après plus de trois mois de culture. Le tableau n°8 donne les résultats suivants :

- Le milieu témoin sans BAP a donné les taux les plus élevés de survie pour toutes les espèces comparé au milieu avec une concentration de BAP 1 μ M (0.22 mg/l). Nous avons enregistré chez *Citrus aurantifolia* avec le milieu BAP 0 μ M un taux de survie de 95.55 % alors qu'il est de 91.66 % pour la même espèce dans le milieu avec BAP 1 μ M (0.22 mg/l).
- Par contre, dans le milieu avec une concentration de BAP 10 μ M (2.25 mg/l), nous n'avons noté aucune survie sur l'ensemble des explants cultivés pour toutes les espèces.

Au total 540 méristèmes ont été excisés et mis en culture pour l'ensemble des trois milieux.

En comparant ces résultats à ceux obtenus avec la kinétine combinée à la GA₃, nous avons retenu les points suivants :

- * Les deux milieux de culture n'ont pas permis de déclencher une croissance méristématique capable d'assurer une subculture.
- * Cependant, dans les milieux avec BAP 0 μ M et 1 μ M (0.22 mg/l), les explants ont survécu après trois mois de culture en absence d'une croissance véritable.
- * Dans le milieu avec kinétine, même chez le témoin, les explants meurent après quelques jours de culture

Par conséquent, au delà de l'effet d'un éventuel excès des doses hormonales avec la kinétine 10 μ M (2.15 mg/l) et 50 μ M (10.76 mg/l), le milieu de base ne semble pas être approprié. En effet, la différence majeure entre ces deux milieux de base réside dans la forte présence de l'azote dû à l'hydrolysate de caséine 80 mM (11.16 g/l) dans le milieu avec kinétine. Il se pourrait donc qu'un excès d'azote soit à l'origine de la dégénérescence rapide des méristèmes mis en culture.

3) Initiation de méristème à partir de matériel jeune

3.1. Milieu d'initiation

Le milieu de Murashige & Skoog (1962) est complexé avec de la BAP 1 μ M (0.22 mg/l) de l'ANA 0.1 μ M (0.019 mg/l) et de la GA₃ 50 μ M (17.32 mg/l).

Plus de 80 méristèmes provenant de la germination de graines de *Citrus sinensis* (matériel végétal jeune) ont été excisés et mis en culture. Au bout d'un mois de culture, les jeunes microboutures provenant de la croissance des méristèmes sont cultivées sur un milieu de subculture (= milieu de propagation). Il faut noter que certains méristèmes bien que vivants, ne se développent pas suffisamment pour assurer la subculture. Globalement, nous

Tableau n°10 : Appréciation de la croissance des pousses en phase de subculture II.

	Après 15 jours de culture				Après 30 jours de culture			
	Longueur moyenne des tiges (cm)	Taille maximale (cm)	Nombre moyen de tiges	Ramification maximale	Longueur moyenne des tiges (cm)	Taille maximale (cm)	Nombre moyen de tiges	Ramification maximale
Apex	1.19	3	1.69	4	1.27	3.5	2	5
Entre noeuds	1.03	3.2	2	6	1.73	4.5	3	9

Légendes :

Taille des explants de départ = 1 cm

Nombre d'apex = 99

Nombre d'entre-noeuds = 51

Tableau n°11 : Effet de l'AIB 10 μ M et de l'ANA 0.1 μ M sur l'enracinement

	Nombre de jours	20	35	70	120
*Nombre d'explants enracinés	ANA 0.1 μ M	1	10	30	43
	AIB 10 μ M	-	-	2	12

* L'effectif est de 144 explants et 138 explants respectivement sur les milieux d'enracinement avec ANA 0.1 μ M et AIB 10 μ M

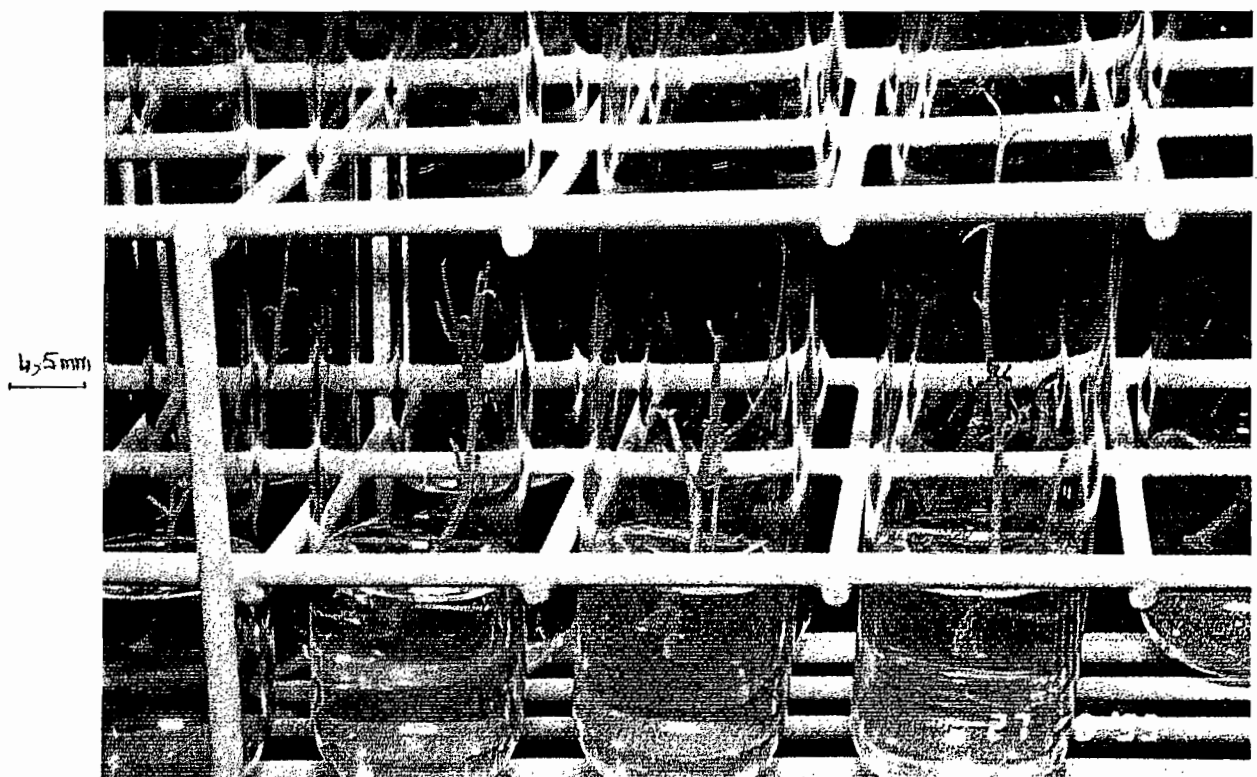


Planche n°4 : Microboutures de *Citrus sinensis* en phase de subculture I, issues de la culture de méristème de matériel végétal jeune

avons eu un taux de survie de 89.15 % et un taux de croissance de 60.24 % (tableau n°9). Il n'y a pas eu de contamination et seuls 9 dessèchements ont été relevés.

Nous avons noté une bonne prolifération de bourgeons à partir des méristèmes ayant repris leur croissance. La composition du milieu de culture semble bien appropriée lors de cette phase d'initiation de méristème de *Citrus sinensis* à partir de matériel végétal jeune, en comparaison avec le matériel végétal adulte. Des contraintes physiologiques, variétales pourraient être à l'origine des écarts de croissance constatés entre ces deux types de matériel biologique.

3.2. Microboutures de première subculture

Par rapport au milieu d'initiation, seule la concentration de GA₃ a été modifiée, passant de 50 µM (17.32 mg/l) à 5 µM (1.73 mg/l). A partir de la phase d'initiation, la subculture s'est faite sur 50 explants avec une taille approximative de 1 cm (planche n°4).

Tous les explants mis en culture ont repris une bonne croissance et une bonne prolifération axillaire après un mois de subculture, paramètres que nous nous avons quantifié en phase de subculture II.

3.3. Microboutures de deuxième subculture

Nous avons utilisé le même milieu et les mêmes concentrations d'hormones qu'en phase de subculture I. A partir de la subculture I, une deuxième subculture a lieu avec un effectif de 157 explants correspondant à 102 apex et 55 entre-nœuds. La taille des explants est de 1cm environ.

La subculture a duré également un mois et tous les quinze jours, la longueur et le nombre de tiges sont mesurés. Dans la première série, 7 explants sont perdus par dessèchement correspondant à 3 apex et 4 entre-nœuds. Le tableau n°10 donne les résultats sur la moyenne des mesures en longueur et en nombre de tiges après 15 jours et 30 jours de culture.

Ces résultats montrent que les tendances qui se dégagent dès les premières mesures après 15 jours de culture, se maintiennent après 30 jours de culture. Les explants formés d'entre-nœuds présentent des ramifications plus abondantes et une taille plus élevée par rapport aux explants formés d'apex. Ce résultat traduit une propriété fondamentale de la culture *in vitro*, qui est la capacité des vitroplants à assurer la propagation en masse d'individus issus d'un même clone.

Il n'y a pas eu de contamination comme pour la phase de subculture I.

4) Enracinement des microboutures de *Citrus sinensis* (variété locale) issues de matériel jeune

La subculture II s'est faite avec un effectif de 157 explants et après un mois de culture, nous avons utilisé ces microboutures pour l'enracinement. Au cours de cette phase d'enracinement, le milieu MS (1962) de base est conservé et nous avons testé l'effet de deux hormones : l'ANA 0.1 µM et l'AIB 10 µM correspondant respectivement à 0.019 mg/l et à 2.032 mg/l. Au total 282 explants avec une taille approximative de 1cm sont mis en culture dont 138 sur le milieu d'enracinement avec AIB et 144 sur le milieu avec ANA.

4.1. Effet de l'ANA et de l'AIB sur l'enracinement

Tableau n° 12 : Evolution des plantules enacinéées au cours de l'acclimatation

Nombre de plants acclimatés	Nombre de plants après 3 mois d'acclimatation
21	21

Tableau n°13 : Taux de reprise des microgreffes sur mottes "Mil-Cap"

Taux de reprise en %			
Homogreffes			Hétérogreffes
<i>Citrus grandis</i>	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Citrus reticulata</i>	<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i> sur <i>Citrus reticulata</i>
0/24 0	4/24 16.66	8/24 33.33	2/24 8.33



Planche n°5 : fig. n°1 : Enracinement de pousses à partir de la culture de méristème de *Citrus sinensis* (matériel végétal jeune)



Planche n°5 : fig. n°2 : Plantes issues de la culture de méristème de *Citrus sinensis* acclimatées en serre

La première ébauche de racine apparaît dans le milieu d'enracinement avec AIB 10 μ M (2.032 mg/l) après 22 jours de mise en culture.

Après 35 jours de culture, nous avons noté dans les tubes avec AIB 10 μ M (2.032 mg/l) une dizaine d'explants enracinés alors que dans les tubes avec ANA 0.1 μ M (0.019 mg/l), il n'y avait encore aucune apparition d'ébauche racinaire.

Les premières ébauches de racines dans les tubes avec ANA 0.1 μ M (0.019 mg/l) apparaissent après plus de deux mois de culture. Au même moment, nous avons enregistré une trentaine d'enracinements dans les tubes avec AIB.

Après quatre mois de culture, seuls 12 enracinements ont été relevés dans le milieu avec ANA et 43 dans celui avec AIB (tableau n° 11).

Le pourcentage d'enracinement reste assez faible (12.5 %) dans le milieu MS (1962) associé à l'ANA 0.1 μ M (0.019 mg/l), par contre il est de 47.2 % dans le milieu avec AIB 10 μ M (2.032 mg/l). Il serait intéressant dans ce dernier cas de tester le comportement des microboutures à l'enracinement en variant la dose hormonale.

Une à deux racines pivotantes (avec un maximum de quatre) émergent de la surface de la base des explants et croissent dans le milieu de culture. Nous n'avons pas noté l'apparition d'un cal basal lors de la formation des racines (planche n° 5, fig. n° 1).

Il faut signaler cependant que cette phase d'enracinement a été marquée par une forte contamination, une cinquantaine dans les deux types de milieux au bout de deux mois de culture.

5) Acclimatation

Les plantes enracinées et sorties des tubes sont ensuite acclimatées. Le repiquage se fait en pots contenant un mélange de tourbe et de sol stérile. Les pots sont maintenus dans des mini-serres, le tout exposé dans une pépinière ombragée. Progressivement, les volets des mini-serres sont relevés jusqu'à ce qu'on enlève totalement les couvercles (planche n° 5, fig. n° 2).

Au cours cette phase, 21 plants ont été acclimatés et nous avons noté une reprise de croissance de l'ensemble des pieds après 3 mois d'acclimatation. Le tableau n°12 donne l'évolution des plants enracinés au cours de l'acclimatation

III. LE MICROGREFFAGE

Nous avons successivement utilisé comme support du porte-greffe le pont de papier filtre et la motte "Mil-Cap".

* Avec *Citrus sinensis*, 68 homogreffes ont été effectuées, le support étant le pont de papier filtre percé au milieu d'un trou par où passent les racines du porte-greffe. Le milieu de culture est celui de Murashige et Skoog (1962) en absence d'hormone.

Au total 9 microgreffes ont réussi ce qui donne un taux de reprise de 13.23 %.

Pour les homogreffes n'ayant pas repris, nous avons constaté un dessèchement du greffon. Il faut cependant noter qu'environ 2/3 des greffons dégénérés sont consécutifs au dessèchement de l'extrémité de la surface de coupe des porte-greffe.

Après un mois de culture, les greffes réussies sont transférées sur un nouveau milieu MS (1962).

Les racines sont à nouveau réduites pour faciliter leur passage par le trou du pont. Après quelques jours de culture, elles développent à leur extrémité une boursoufflure semblable à un anneau.

Les racines deviennent de plus en plus épaisses comme si la croissance de l'explant ne se faisait qu'à ce niveau. Les explants jaunissent progressivement de même que le milieu de culture. Il y'a eu comme un arrêt de l'absorption d'eau de la plante par ses racines, aboutissant à la mort des pieds greffés. Les racines des porte-greffe ne semblent pas supporter les blessures dues aux différentes opérations de transferts des microgreffes.

* C'est dans le but de parer à toute manipulation pouvant affecter l'intégrité racinaire et par souci de commodité (il est plus aisé de travailler sur un porte-greffe solidement lié à une motte) que nous avons substitué au pont de papier filtre la motte "Mil-Cap".

Les premières expériences portent sur des homogreffes de *Citrus grandis* avec un effectif de 24 explants. Il n'y a pas eu de dessèchement de porte-greffe. Par contre nous avons noté au niveau de la surface de coupe du porte-greffe une prolifération de pousses chassant progressivement le greffon sur la périphérie.

Des homogreffes de *Citrus sinensis*, de *Citrus reticulata*, de même que des hétérogreffes de *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* sur *Citrus reticulata* ont été effectuées. Le tableau n°13 donne l'ensemble des résultats obtenus lorsque le microgreffage se fait avec la motte "Mil-Cap" comme support.

Pour les homogreffes, les taux de réussite sont de 0 %, 16.66 %, 33.33 % respectivement chez *Citrus grandis*, *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata*.

Les hétérogreffes concernent uniquement l'hybride *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* sur *Citrus reticulata* comme porte-greffe avec un taux de réussite de 8.33 %.

Nous avons noté que pour l'ensemble des greffes non réussies, il y'a émergence de nouvelles pousses sur la surface de coupe des porte-greffe. Le bourgeon qui va croître ressemble à la simple observation à une greffe qui a parfaitement repris.

Les résultats obtenus en comparant homogreffes et hétérogreffes, ne permettent pas de déceler une différence nette d'aptitude à donner un bon résultat entre ces deux méthodes même si des incompatibilités entre porte-greffe et greffons sont souvent signalées par les auteurs (Bones et Druart, 1985).

D. DISCUSSION

I. LA GERMINATION

* Nous avons noté une nette différence du point de vue rapidité à faire germer les graines de *Citrus reticulata* décortiquées et celles restées intactes. Les semis non décortiqués ont mis 25 jours pour germer alors que les semis décortiqués ou incisés germent après 3 à 10 jours de mise en culture.

L'enveloppe des graines jouerait probablement une barrière bloquant la facilité d'imbibition des graines.

Rappelons que les graines de *Citrus limon* ont été incisées car les lobes cotylédonnaires se séparent en les décortiquant. Nous n'avons pas comparé pour cette même espèce le temps de germination des graines décortiquées et celles non décortiquées pour mieux apprécier l'effet de l'incision. Cependant, les graines de *Citrus limon* incisées, de *Citrus grandis* et de *Citrus sinensis* décortiquées ont pratiquement germé dans le même intervalle de temps.

* Nous avons noté peu de contamination quand la désinfection se fait avec du chlorure mercurique à 1 g/l pendant 30 mn. Par contre, le taux de germination est très faible allant de 0 à 26.31 %.

Avec l'hypochlorite de calcium à 7 % pour un temps égal de désinfection, le taux de graines germées est assez satisfaisant (plus de 80 %) même si le taux de contamination reste relativement élevé, allant jusqu'à 50 %.

Le chlorure mercurique de par son action sur les tissus internes du végétal, attaquerait l'embryon, ce qui peut expliquer le faible taux de germination enregistré.

Il faut noter par ailleurs que le taux de graines germées doit être souvent discuté par rapport au taux de graines contaminées. En effet les graines sont prégermées dans des bocaux (10 à 16 graines), ce qui fait qu'une seule graine polluée non détectée, peut entraîner la perte de toutes les graines du bocal s'il n'y a pas eu de transfert rapide. Ainsi, le taux de contamination peut être élevé alors que la désinfection est relativement bonne. Comme on soustrait au calcul du taux de graines germées les graines polluées, plus la contamination est élevée, plus le taux de graines ayant germé l'est également et cette proportionnalité ne reflète pas toujours la réalité. Il serait intéressant de faire germer séparément les graines pour mieux circonscrire les problèmes de contamination.

* Les différentes opérations de semis effectuées montrent que les *Citrus* présentent une hétérogénéité poussée dans le délai à faire germer les graines. Nous avons relevé pour un même lot de graines germées des écarts allant jusqu'à deux mois. Ceci pose le problème de la disponibilité du matériel biologique dans un intervalle de temps donné comme c'est le cas pour l'obtention de porte-greffe.

* L'effet de la durée de conservation des graines sur leur aptitude à germer a été étudié. Il ressort de cette analyse que le taux de graines germées diminue avec la durée du temps de stockage des graines. Par conséquent, il n'est pas recommandé de conserver pour une longue

durée des graines de *Citrus*. Les graines de tous les *Citrus* perdent rapidement leur faculté germinative après dessiccation (Praloran, 1971).

En tenant compte de l'hétérogénéité constatée dans les délais à faire germer les graines, de la perte du pouvoir germinatif des graines après dessiccation, il faut impérativement, pour s'assurer d'un bon taux de germination synchrone, utiliser un effectif élevé de graines fraîchement récoltées des fruits de *Citrus*.

Nous avons également constaté la forte présence de plusieurs embryons sur une seule graine, ce qui confirme la grande fréquence de la polyembryonie chez les *Citrus*.

II. LA CULTURE DE MERISTEME

1) Tests de désinfection des microboutures issues de pieds-mères

La désinfection des explants provenant de plantes mobilisées en serre nous a permis de faire les observations suivantes :

- 1) Les plus grands taux de contamination des explants micopropagés s'accompagnent toujours d'un bon taux de reprise. En effet, la forte contamination traduit un effet mineur du désinfectant qui n'a pas non plus affecté l'intégrité des tissus de l'organe mis en culture. Il se pourrait également que les micro-organismes infestants, par leurs diverses activités métaboliques, sécrètent des substances chimiques susceptibles de stimuler une reprise de croissance.
- 2) Les microboutures jeunes peu lignifiées se dessèchent le plus souvent, comparées à celles plus ligneuses avec les diverses solutions utilisées pour la désinfection. Le désinfectant semble altérer les tissus des explants et cette nocivité est plus accentuée lorsque la désinfection se fait avec le chlorure mercurique à 1 g/l. L'hypochlorite présente une action de surface sur l'explant à désinfecter, par contre, le chlorure mercurique attaque les tissus internes de l'organe. Ainsi les jeunes microboutures résistent moins à l'effet du désinfectant comparées aux explants plus lignifiées, ce qui pourrait expliquer les cas plus fréquents de dessèchement observés chez les jeunes explants issus de la micropropagation à partir de rameaux des pieds-mères.

L'utilisation combinée des deux types de désinfectants s'est révélée être un bon protocole.

Seule l'étape de la désinfection des explants a posé quelques problèmes dans ce chapitre réservé au microbouturage par la culture de noeuds axillaires issus de rameaux des pieds-mères. Le milieu de Murashige et Tucker (1969) a été très approprié et assure une bonne reprise de croissance des explants. Il constitue de ce fait un milieu favorable pour faire de la micropropagation.

2) Effet des balances hormonales sur l'initiation de méristème à partir de matériel adulte

* Effet de la kinétine combinée avec la GA₃

Nous avons noté une absence de survivants lors de l'initiation de méristème à partir de matériel végétal âgé sur les milieux avec ou sans kinétine. Nous avons noté également un retard au dessèchement des explants sur les milieux témoin et kinétine 1 μ M (0.21 mg/l). Par contre, pour les concentrations de kinétine 10 μ M (2.15 mg/l) et 50 μ M (10.76 mg/l), les

explants se nécrosent très rapidement. Ces deux dernières doses semblent nocives pour les explants.

Par ailleurs, l'absence quasi générale de reprise des méristèmes sur les différents milieux avec kinétine pouvait ne pas dépendre des doses hormonales. En effet, bien qu'on ait utilisé les macroéléments de MS dilués de moitié, il est fort probable qu'un excès d'azote avec la forte présence de l'hydrolysate de caséine (11.16 g/l) soit à l'origine de l'absence de croissance des explants.

La molarité de l'azote total est de 82 mM, ce qui est de loin supérieure à celle du milieu de Murashige et Skoog (1962) qui est de 60 mM. L'utilisation du même protocole en éliminant la partie azotée des macroéléments de MS (1962) pourrait se révéler plus prometteuse. D'ailleurs certains auteurs considèrent que le milieu de MS (1962) renferme déjà une teneur trop forte en azote (Margara, 1984).

* Effet de la BAP combinée à l'ANA et à la GA₃

Le taux de survie sur l'ensemble des cultures ne permet pas de déceler des différences de comportement en fonction de l'espèce. Par contre, nous pouvons noter avec la concentration de BAP 1 μ M (0.22 mg/l), une différence plus ou moins nette de comportement entre les espèces *Citrus aurantifolia* et *Citrus paradisi* dont les taux respectifs de survie sont de 91.66 % et 50 % soit environ 40 % d'écart.

Le milieu témoin sans BAP a donné les meilleurs taux de survie (jusqu'à 95.55 % avec *Citrus aurantifolia*).

Omura et Hidaka (1992) travaillant sur *Citrus unshiu* x *Citrus sinensis* (= Kiyomi tangor) et *Citrus unshiu* (Marc.) (= Aoshima unshiu satsuma mandarin), ont eu des taux respectifs de survie de 66 et 92 % avec le milieu témoin. Pour les mêmes cultivars, la dose de BAP 1 μ M (0.22 mg/l) donne les taux de survie respectifs de 50 et 80 %, alors que le meilleur pourcentage obtenu l'est avec la BAP 0.1 μ M qui a donné 100 % de survie avec Aoshima unshiu. Sauton et al. (1982), travaillant sur *Citrus sinensis* ont utilisé de la BAP à 0.5 mg/l (plus de 2 μ M).

Il n'y a pas eu de survie quand l'initiation de méristème se fait sur un milieu de culture avec de la BAP 10 μ M (2.25 mg/l) pour toutes les variétés. En utilisant cette même dose de BAP sur les cultivars Kiyomi tangor et Aoshima unshiu, Omura et Hidaka (1992) ont obtenu des taux de survie respectivement égaux à 0 et 6 %. La dose de BAP 10 μ M (2.25 mg/l) serait assez forte pour stimuler la reprise de croissance du méristème.

Au bilan, les méristèmes provenant de matériel végétal adulte mis en culture n'ont pas permis de passer à l'étape de la subculture. Par contre certains explants ont survécu au delà de trois mois de culture comme c'est le cas de *Citrus aurantifolia* avec un taux de survie de 95.55 % sur le milieu avec BAP 0 μ M. Il serait probable en faisant des recombinaisons sur les compositions des milieux de culture de trouver une formule à même de déclencher une reprise de croissance du méristème.

3) Régénération de plantes entières par la culture de méristème à partir de matériel jeune

Après un mois de culture, les méristèmes mis en culture ont proliféré et deux subcultures ont été faites.

Les facteurs pouvant être pris en compte dans l'induction de la croissance des méristèmes incluent les conditions de milieu, les techniques culturales, les différences variétales, la juvénilité des explants. Pour la croissance des méristèmes de *Citrus*, l'addition de cytokinine (Kitto et Young, 1981; Moore, 1986) et de la GA₃ (Mori et al., 1987) est très importante. Au cours de nos travaux, nous avons utilisé le milieu MS (1962) complété avec de

la BAP 1 μM (0.22 mg/l), de l'ANA 0.1 μM (0.019 mg/l) et de la GA₃ 50 μM (17.32 mg/l) qui semble très approprié.

La différence dans la réponse de croissance entre la culture de pousses jeunes et adultes a été confirmée chez les *Citrus* (Altman et Goren, 1977). Si les méristèmes provenant de graines germées de *Citrus* ont été propagés par la culture *in vitro* (Kitto et Young, 1981; Starrantino et Caruso, 1987), ceux de matériel adulte n'ont pas été cultivés avec succès. Nous n'avons pas failli à la règle bien qu'ayant utilisé une méthode assez proche de celle de Omura et Hidaka (1992), dont les travaux restent sans nul doute une première.

Nous avons procédé à deux phases de subcultures à partir des microboutures obtenues par la culture de méristème. Les résultats sont positifs avec des ramifications allant jusqu'à 9 tiges et une taille maximale de 4.5 cm. Les microboutures à partir d'entre-noeuds ont donné en moyenne la plus grande taille et la plus grande ramification que celles provenant d'apex. Les méristèmes axillaires une fois libérés des corrélations inhibitrices dues au fonctionnement de l'apex, entament une forte activité de croissance. La bonne croissance des explants lors des différentes phases de subcultures dénote de l'aptitude à la micropropagation des *Citrus*.

Le milieu de subculture ne diffère de celui d'initiation que par la concentration de la GA₃ qui passe de 50 μM (17.32 mg/l) à 5 μM (1.73 mg/l). En effet, Omura et Hidaka (1992) notent que des doses élevées de GA₃ (50 à 100 μM) induisent une croissance anormalement tordue accompagnée d'étiollement. Ils ont montré que l'addition de 1 à 10 μM de GA₃, 0.5 à 1 μM de BAP et 0.05 à 0.5 μM d'ANA au milieu de culture, induit des taux élevés de croissance.

Les deux niveaux auxiniques utilisés, montrent que l'AIB 10 μM (2.032 mg/l) a été plus favorable à l'enracinement que l'ANA 0.1 μM (0.019 mg/l).

Barlass et Skene (1982) rapportent que des niveaux élevés d'auxines exogènes tels que 10 μM d'ANA étaient nécessaires pour l'enracinement *in vitro* des pousses. Il existe une différence variétale dans l'induction racinaire chez les *Citrus* (Omura et Hidaka, 1992).

Nos plants enracinés ont donné jusqu'à 4 racines pivotantes ce qui est une bonne amélioration des conditions d'enracinement *in vitro* d'explants issus d'espèces ligneuses

III. LE MICROGREFFAGE

Pour un effectif de 68 homogreffes avec *Citrus sinensis* sur pont de papier de filtre comme support du porte-greffe, nous avons obtenu un taux de réussite de 13.23 %.

Quand le support est une motte "Mil-Cap", le taux de réussite le plus élevé est de 33.33 % pour les homogreffes avec *Citrus reticulata*. Ce taux est de 8.33 % pour les hétérogreffes de *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* sur *Citrus reticulata*.

Les deux méthodes utilisées dans le choix du support du porte-greffe traduisent au delà des différences notées sur les taux de réussite, une différence plus fondamentale à l'observation des explants.

Nous avons noté un fort taux de dessèchement des porte-greffe avec le pont de papier filtre comme support. Mieux, au niveau des greffes ayant réussi, les racines du porte-greffe n'ont pas supporté une deuxième diminution lors du transfert des explants sur un nouveau milieu de culture.

La motte "Mil-Cap" par contre, en plus des facilités de manipulation qu'elle offre, assure au porte-greffe une bonne vigueur. La vivacité du porte-greffe se traduit cependant par

une prolifération des pousses au niveau de la surface de coupe chassant sur les bords le méristème posé.

En effet, les plantules de *Citrus* tendent à produire sur les sites de blessure des pousses adventives (Murashige et al., 1972). Il est recommandé que le porte-greffe présente une distinction morphologique par rapport à celle du greffon. Le citrange "Troyer" et le *Poncirus trifoliata* sont utilisés comme marqueurs de par la structure trifoliée de leurs feuilles. Les résultats obtenus confirment l'ambiguïté à pouvoir distinguer une reprise de croissance du greffon d'une pousse axillaire. Cette dernière ressemble souvent parfaitement à un microgreffage normal.

Il serait intéressant en conservant le support "Mil-Cap" de pratiquer un greffage en "T" renversé au niveau de l'écorce, ce qui pourrait éviter les inconvénients cités plus haut.

La croissance des greffons a été lente sur l'ensemble des greffes ayant repris. Ceci peut s'expliquer par l'absence de régulateurs de croissance dans le milieu de culture comme la GA_3 .

E. CONCLUSION

Au terme de cette étude, plusieurs points ont été retenus dont nous tentons de faire la synthèse.

Les graines de *Citrus*, par la perte de leur pouvoir germinatif avec le temps, par le manque d'homogénéité dans la chronologie de la germination, constituent une semence délicate à utiliser. Cependant ces problèmes posés peuvent devenir secondaires grâce au développement des techniques de micropropagation soit par microbouturage (Barlass et Skene, 1982; Moore, 1986), soit par embryogenèse somatique (Button et Kochba, 1977). Nous avons montré qu'en décortiquant ou en incisant les graines et en utilisant une semence fraîche, il était possible d'obtenir un bon taux de germination.

Le milieu de Murashige et Tucker, (1969) est très approprié et montre que la micropropagation par culture de noeuds axillaires issus de rameaux des pieds-mères est très aisée. L'aptitude à la micropropagation des 4 espèces de *Citrus* utilisées lors de nos expérimentations en est une confirmation.

Nous avons réussi à régénérer par la culture de méristème à partir de matériel jeune, des plantes entières soumises aux conditions horticoles. Il se pose souvent un problème d'enracinement chez les ligneux, nous avons montré que les boutures obtenues après deux phases de subcultures s'enracinent allant jusqu'à donner 4 racines pivotantes. Ce résultat nous pousse à ne plus considérer les difficultés d'enracinement observées chez les ligneux comme un facteur limitant à la culture de méristème. Pendant la période de l'expérimentation, nous avons pu accomplir deux subcultures, il serait intéressant en multipliant les subcultures de tester la capacité des microboutures à s'enraciner.

La réussite de la culture de méristème comme exemple de microbouturage est cependant plus recherchée avec du matériel biologique adulte ayant déjà exprimé toutes ses potentialités. Chez les *Citrus*, les caractères recherchés sur la plante adulte ne se reflètent pas au niveau des semis. En effet, l'apomixie partielle de nombreux agrumes limite leur utilisation comme géniteur femelle ou comme parent d'autofécondation (Perrier et al., 1992). De même, l'autoincompatibilité gamétophytique a été mise en évidence chez de nombreuses variétés monoembryonnées d'agrumes (Soost, 1969). La culture de méristème à partir de matériel végétal âgé ne nous a permis de faire des subcultures. Nous avons tout au plus réussi à maintenir en vie ces méristèmes au delà de trois mois de culture en absence d'une réelle croissance. Il serait intéressant de tester d'autres milieux de cultures ayant servi à la culture de méristème en faisant varier les doses hormonales.

Les résultats obtenus avec le microgreffage de méristème montrent que cette technique peut se substituer valablement à la culture de méristème afin de résoudre les limitations que posent le problème de réactivation et d'enracinement de l'explant chez les ligneux. Seule la variété *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* a été microgreffée sur *Citrus reticulata* en ce qui concerne le matériel végétal adulte avec un taux de réussite relativement faible de 8.33 %. Cependant ce résultat a toute son importance si l'on sait que tous les milieux d'initiation testés n'ont pas permis la régénération de microbouture par la culture de méristème à partir de matériel végétal âgé. La motte "Mil-Cap" en conservant l'intégrité des racines reste également plus facile à manipuler en comparaison avec le pont de papier filtre. Il serait intéressant afin d'éviter les risques de repousses sur la surface de coupe des porte-greffe de pratiquer une incision en "T" renversé sur l'écorce du porte-greffe pour y déposer le méristème coupé.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, A. 1972 An improved medium for strawberry meristem culture. J. Hortic.Sci.,49 209-210
- Alskieff, J. & Gautheret M.R. 1977 Sur le greffage *in vitro* d'apex sur des plantules décapitées de Pêcher (*Prunus persica*,Batsch). C.R. Acad. Sci., Sér. D., 284 2499-2502
- Alskieff, J. & Villemur, P. 1980 Greffage *in vitro* d'apex sur des plantules décapitées de Pommier. C.R. Acad. Sci., Sér. D. 1115-1118
- Altman, A. & Goren, R. 1977 Horticultural and physiological aspects of *Citrus* bud culture. Acta Horticulturae 78 51-60
- Auge, R.; Beauchesne, G.; Boccon-Gibot, J.; Digot, B.; Minier, R.; Morand, J.Cl.; Decourtye, L.; Oudin, Y., Vidalie, H. 1982 La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Techniques et documentation (Lavoisier)
- Ball, E. 1946 Developpement in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus albus* L. L. Am. J. Bot., 33 301-318
- Barlass, M. & Skene, K.G.M.1982 *In vitro* plantlet formation from *Citrus* species and hybrids.
IN : Plant Culture Media : Formulations and uses. E.F. George; D.J.M. Puttock & H.J. George, Vol.1, 54-55
- Berthon, J.Y. 1990 Régulation de la rhizogenèse : Cas d'une espèce ligneuse le *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand I 1-142
- Biran, I. & Halevy, A.H. 1973 Endogenous levels of growth regulators and their relationship to mechanical injury and ethylene Plant Physiol., 28 436-442
- Bones P. & Druart P. 1986 Virus-Free Trees Through Tissue Culture (chapter II) In : Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 1 : Trees (ed. by Y.P.S. Bajaj) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 24-30
- Bouillenne, R. 1964 Aspects physiologiques de la formation des racines. Bull, Soc. R. Bot. Belg., 95 193-204
- Boxus, P. 1974 The production of stawberry plants by *in vitro* micropropagation. J. Hortic. Sci., 49 209-210
- Boxus, P. & Druart, P. 1986 Virus-free trees through tissue culture In : Bajaj, Y.P.S. (ed). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.I : Trees, Springer-Verlag, Berlin. 111-122
- Broome, O.C. & Zimmerman, R.H. 1984 Culture of shoot meristem : Fruits plant. In : Vasil, I.K. (ed), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol.1, Laboratory Procedures and their Applications, Academic Press, Inc. New York 111-122

- Button J. & Kochba J. 1977 Tissue culture in the citrus industry In : Reinert & Y.P.S. Bajaj (eds). Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue and organ culture, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 70-92
- Buvat, R. 1955 Le méristème apical de la tige. 596-656
- Cauvin, B. & Massoc, B. 1992 Teneur en composés phénoliques et aptitude à l'enracinement de clones d'*Eucalyptus gunnii*. Annales Afocell. 409-415
- Champagnat, M.; Ballade, P. & Porte, J. 1967 Introduction à l'étude expérimentale de l'organogenèse axillaire du Cresson (*Nasturtium officinale*). Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., 110 1-100
- Chapot, H. 1954 Standardisation des appellations d'espèces, variétés et hybrides chez les agrumes C.R. du III^e congrès International de l'agrumiculture méditerranéenne, Alger
- CIRAD 1995 Plantes d'hier, d'aujourd'hui et de demain. Dossier de la mission connaissance et amélioration des plantes. 11-13
- Clowes, F. 1961 Apical meristems Blackwell Oxford.
- De Fossard, R.A. 1977 Tissue culture in Horticulture. A perspective. Acta horticultrae, 78 455-459
- Direction de l'horticulture 1995 Evolution de la production fruitière au Sénégal.
- Favre, J.M 1977 La rhizogenèse. Aspects divers d'un processus d'organogenèse végétale. Ann. u. Abidjan, Sér. C., 1-100
- Foster, A. 1938 Structure and growth of the shoot apex in *Ginkgo biloba*. Bull. Torrey Bot. Club., 65 531-556
- Gaspar, Th. & Coumans, M. 1987 Root formation In : "Cell and Tissue culture in forestry". J.M. Bonga and D.J. Durjan eds, Martinus Nijhoff. Publishers, Dordrecht, vol. 2 202-217
- Gaspar, Th.; Kevers, C.; Hausman, J.F. & Berthon, J.Y. Juin 1990 Rooting *in vitro* : fundamental data for new strategies. Soc. de Physiologie végétale. Gemboux, 1 39
- George, E.F. & Sherrington, P.D. 1984 Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory for commercial laboratories. Exegetics Ltd., England.
- Hackett, W. & Anderson, J. 1967 Aseptic multiplication and maintenance of differential carnation shoot tissue derived from shoot apices. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci., 90 365-369
- Hansen, A.J. & Lane, D 1983 Inhibition of apple chlorotic leaf spot virus in meristem tissue. Plant Dis. Rep.
- Huang, S.C. & Millican, D.F. 1980 In vitro micrografting of apple chlorotic leaf spot virus in apple meristem tissue. Plant Dis. Rep

- Hume, H.H. 1957 Citrus Fruits. The Mac Millan Company, New York
- Hu, C.Y. & Wang, P.J. 1983 Meristem, shoot tip, and bud cultures. In : Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. & Yamada, Y.(eds), Handbook of Plant Cell Culture, Vol.1, Technics for propagation and breeding. Macmillan Publishing Co., New york. 177-227
- Huth, W. & Bode, O. 1970 Befreiung völlig infizierter Kartoffelsorten von infektionen des Kartoffel S virus durch Meristem Kultur Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz dienstes, 22 37-39
- Jonard, R.; Hugard, J.; Macheix, J.; Martinez, J.; Mosella-Chancel, L. 1983 Poessel, J.L. & Villemur, P. In vitro micrografting and its applications to fruit science Scientia Horticulturae, 2 147-159
- Jonard, R.; Soedharma, I. & Villemur, P. 1987 Analyse de l'influence de divers facteurs sur l'amélioration des réussites au microgreffage chez les agrumes C.R. Acad. Sci. Paris, Série III, 305 45-49
- Kartha, K.K. 1981 Meristem culture and cryopreservation. Methods and applications. In : Thorpe, T.A. (ed), Plant tissue culture. Methods and applications in Agriculture. Academic Press. New York 182-211
- Kartha, K.K. 1984 Elimination of viruses. In : Vasil, I.K. (ed), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.1, Laboratory Procedures and their applications. Academic Press; Inc. New York
- Kassanis, B. & Varma, A. 1967 The production of virus-free clones of some british potato varieties Ann. Appl. Bol. 59 447-450
- Kevers, C.; Menard, D.; Marchand, S.; Hausman, J.F. & Gaspar, Th. 1990 Enracinement *in vitro* et *ex vitro* et comportement à l'acclimatation de *Kalmia* et de *Rhododendron* multipliés *in vitro*. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 55 (3b) 1267-1274
- Kitto, S.L. & Young, M.J. 1981 *In vitro* propagation of Carrizo HortScience 16 305-306
- Kulescha, Z. 1952 Recherche sur l'élaboration de substances de croissance par les tissus végétaux. Rev. Gen. Bot., 59 92-111
- Limasset, P. & Cornuet, P. 1949 Recherche de virus de la mosaïque de tabac (*Marmor tabaci* Holmes) dans les méristèmes des plantes infectées. C.R.Hebd.Seances. Acad. Sci., 228 1971-1972
- Margara, J. 1984 Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse 254
- Martin, C. 1980 La multiplication végétative *in vitro* : une technique de pointe au service de l'agriculture. C.R.Acad.Fr., 66 629-637
- Martinez, J.; Hugard, J. & Jonard R. 1979 Sur les différentes combinaisons de greffages des apex réalisés *in vitro* entre pêcher (*Prunus persica* B.), abricotier (*Prunus armeniaca*, L.) et myrobolan (*Prunus cerasifera* F.) C.R. Acad. Sci. Paris, Série D, 288 759-762

- Mellor, F.C. & Stace-Smith, J. 1947 Developpement of excised potato buds in nutrient medium. Can. J. Bot., 47 1617-1621
- Moncousin, C. 1982 Contribution à la caractérisation biochimique et physiologique de la phase juvénile de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) au cours de sa multiplication végétative conforme et accélérée en culture *in vitro*. Thèse université Paris-Sud. Orsay 263-271
- Moncousin, C. & Gaspar, Th. 1983 Peroxydase as a Marquers for rooting improvement of *Cynara scolymus* L., cultured *in vitro*. Biochem. Physiol. Pflanzen, 178 263-271
- Monteuuis, O. & Bon, M.C. 1985 Microbouturage du *Sequoia* géant Annales AFOCEL. 50-87
- Moore, G.A. 1986 *In vitro* propagation of *Citrus* rootstock HortScience 21 300-301
- Morel, G. & Martin, C. 1952 Guérison de Dahlias atteints d'une maladie à virus. C.R. Acad. Sci., 235 1324-1325
- Morel, G. & Martin, C. 1955 Guérison de pommes de terre atteintes de maladie à virus. C.R. Acad. Agr. Fr.; 41 472-475
- Morel, G. & Martin, C. 1968 Guérison des pommes de terre atteintes de maladies à virus. Ann. Physiol. Veg.; 10 (2) 113-139
- Morel, G. 1960 Producing virus-free Cymbidiums Am. Orchid. Soc. Bull., 29 495-497
- Mori, S.; Hosoi, T. & Ooishi, A. 1987 Investigation of bud culture in *Citrus unshiu* (Mark.) Bull. Tokushima Hort. Exp. Sta. 15 7-17
- Mosella-Chancel, L.; Riedel, M. & Jonard, R. 1979 Sur les améliorations apportées aux techniques de microgreffage des apex *in vitro* chez les arbres fruitiers. Cas du pêcher (*Prunus persica* B.) C.R. Acad. Sci. Paris, Série D, 289 505-508
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures Physiol. Plant., 15. 473-497
- Murashige, T & Tucker D.P.H. 1969 Growth factor requirements of citrus tissue culture. In Chapman H.D. (ed.) Proc. 1st Int. *Citrus* Symp. Vol.3. Univ. Calif., Riverside Publication 1155-1161
- Murashige, T.; Bitters, W.P.; Rangan, T.S.; Nauer, E.M.; Roistacher, C.N. & Holliday, P.B. 1972 A technic of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. Hortiscience, 7(2) 118-119
- Nair, N.G.; Kartha, K.K. & Gambord, O.L. 1979 Effect of growth regulators on plant regeneration from shoot apical meristems of Cassava (*Manihot esculenta* Crants) and on the culture of internodes *in vitro*. Z. Pflanzenphysiol., 95 51-56
- Navarro, L.; Roistacher, C. & Murashige, T. 1975 Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 100 471-479

- Navarro, L. & Juarez, J. 1977 Tissue culture technics used in Spain to recover virus-free *Citrus* plants. *Acta Horticulturae*, 78 425-435
- Negueroles, J. & Jones, O.P. 1979 Production *in vitro* of rootstock/scion combination of *Prunus* cultivars. *Journal of Horticultural Science*, 4 (4) 279-281
- Nitsch, J. P. & Nitsch, C. 1965 Néoformation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts: *Plumbago indica*. *Ann. Physiol. veg.*, 7 251-256
- Nougarède, A. 1965 Organisation et fonctionnement du méristème apical des végétaux vasculaires. Dr. Travaux dédiés à L. Plantefol. Masson. Paris 171-340
- Ollitrault, P. & De Rocca Serra, D. 1992 L'amélioration des agrumes : II. Créations variétales et Biotechnologies. *Fruits*, Numéro spécial Agrumes. 124-134
- Omura, M. & Hidaka, T. 1992 Shoot Tip Culture of *Citrus*. Okitsu Branch, Fruit Tree Research Station. Okitsu, Shizuoka 424-02, Japan. 23-34
- Pennazio, S. & Redolfi, P. 1974 Potato virus X eradication in cultured potato meristem tips. *Potato Res.*, 17 333-335
- Perombelou, N.C.M. 1980 Ecology of the soft-root Erwinias. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 18 361-387
- Perrier X.; Ollitrault P. & Dubois C. 1992 Cartographie du génome et caractères quantitatifs : L'approche biométrique et les contraintes biologiques des agrumes *Fruits*, Numéro spécial Agrumes 135-144
- Pillai, S. & Hilderbrandt, A. 1968 *In vitro* differentiation of *Geranium (Pelargonium hortorum* Bailey) plants from apical meristems. *Phyton.*, 25 81-87
- Plantefol, L. 1948 Fondement d'une théorie nouvelle. Ontogénie de la fleur. *Ann.Sci.Bot.*, 11^e série, 9 35-182
- Popham, R. 1951 Principal types of vegetative shoot apex organization in vascular plants. *Ohio. J. Sci.*, 51 249-270
- Praloran, J. C. 1971 Les Agrumes. Techniques agricoles et productions tropicales. 565
- Quorin, M.; Boxus, P. & Gaspar, Th. 1980 Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature *Prunus* plants. *Physiol. Veg.*, 12(2) 165-174
- Robbins, W. 1922 Cultivation of excised root tips and stem tip under sterile conditions. *Bot. Gaz.*, 73 376-390
- Sané, D. 1994 Clonage d'*Accacia raddiana* (Savi.) : Régénération à partir de jeunes racines excisées. Etude des facteurs de l'enracinement *in vitro*. Mémoire de D.E.A., université Cheikh Anta Diop de Dakar. 1-81

Sauton , A.; Mouras, A. & Lutz, A. 1987 Plant regeneration from *Citrus* root meristems. In : Plant culture Media : Formulations and uses. E.F.George; D.J.M., Puttock and H.J. George, vol.1 54-55

Schnabdrauch, L. S. & Sink, K.C. 1979 *In vitro* propagation of *Phlox subulata* and *Phlox paniculata*. Hortiscience, 14 607-608

Soost, R.K. 1969 The incompatibility gene system in *Citrus* Proc. 1st Int. *Citrus* Symposium, H. Chapman ed. University of California, Riverside, 1 189-190

Starrantino, A. & Caruso A. 1987 Experience on the "*in vitro*" propagation of some citrus rootstocks Acta Horticulturae 212 471-478

Stone, O.M. 1963 Factors affecting the growth carnation plant from shoot apices Ann. Appl. Biol., 52 199-209

Swingle, W.T. 1948 Citrus Industry. Chap.IV (The Botany of *Citrus* and its wild Relatives of the orange subfamily). University of California Press, Berkeley and Los Angeles

Tanaka, T. 1933 Acclimatation des *Citrus* hors de leur pays d'origine Rev. Bot. Appl. et d'Agric. Trop., Juin-Juil., Bull. 142 et 143

Trainer, R. 1965 Acad. Agr. Fr., 6 Oct., 918 (cité par Kartha (1981))

Vardjan, M. & Nitsch, J.P. 1961 La régénération chez *Cichorium endivia* 1 : étude des auxines et des kinines endogènes. Bull. Fr., 108 363-374

Webber, H.J. 1948 Citrus Industry. Chap.I (History and Development of the Citrus Industry). University of California Press, Berkeley and Los Angeles

Webber, H.J. 1948 Citrus Industry. Chap.II (Plant characteristic and climatology) University of California Press. Berkeley and Los Angeles

Wetmore, R. & Morel, G. 1949 Growth and developpement of *Adiantum pedatum* L. on nutrient agar .Am. J. Bot., 36 805-806

Wetmore, R. 1954 The use of *in vitro* cultures in the investigation of growth and differentiation in vascular plants. Brookhaven Symp. Biol., 6 22-40

White, P. 1934 Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaic on growing excised tomato roots. Phytopathology, 24 1003-1011

RESUME

TITRE : Mise en place d'une méthodologie de clonage chez *Citrus sp* : Culture de méristème et Microgreffage *in vitro*.

Nom du candidat : Ousmane M'BODJI

Nature du mémoire : Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Végétale.

Composition du jury : Mr. Amadou Tidiane Bâ Professeur titulaire
Mr. Alain Borgel Chargé de Recherche ORSTOM
Mr. Mékinto Batcho Maître de conférence
Mme. Yaye Kène Dia/Gassama Maître-assistante
Mr. Massaër N'Guer Chercheur à l'ISRA

Soutenu le 23 Novembre au Département de Biologie Végétale (UCAD)

La culture de méristème a été réalisée dans trois perspectives : a) l'étude du fonctionnement du méristème, b) la reconstitution de clones indemnes de virus à partir de plantes-mères infestées, c) la propagation végétative. Le microgreffage est venu en appoint à cette technique pour résoudre les problèmes de réactivation du méristème et d'enracinement des microboutures obtenues chez les ligneux. Dans le domaine des cultures fruitières et principalement chez les agrumes, il est devenu une exigence, une fois les critères de productivité réalisés, d'y allier la qualité du produit. La culture de méristème et le microgreffage *in vitro* assurent dans la plupart des cas, la reconstitution de clones homogènes et assainis. Le travail présenté porte sur plusieurs espèces du genre *Citrus* : *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus grandis* (L.) Osbeck, *Citrus limon* (L.) Burm. F., *Citrus reticulata* Blanco, (variétés locales), *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus paradisi* (Macf.), *Citrus aurantifolia* (Chrism.) Swingle, *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*, (variétés améliorées). Il comprend trois parties : 1) Germination des graines. Il y'a une nette différence dans les délais à faire germer les graines allant de 25 jours à 3-10 jours entre graines intactes et graines décortiquées ou incisées. Le taux de germination diminue nettement avec le temps de conservation des graines. 2) Culture de méristème. Une influence très significative est notée sur la réussite de la culture de méristème suivant que le matériel végétal est jeune ou âgé. L'initiation de méristème et l'enracinement des microboutures obtenues après deux subcultures ont été réalisés avec du matériel végétal jeune, contrairement au matériel végétal âgé où l'étape de l'initiation n'a pas pu être franchie. L'enracinement des microboutures obtenues est meilleur lorsque le milieu de culture contient de l'AIB par rapport à l'ANA. 3) Microgreffage. La motte "Mil-Cap" est meilleure que le pont de papier filtre pour servir de support au porte-greffe. Le microgreffage a été réussi à la fois avec du matériel végétal jeune et âgé contrairement à la culture de méristème.

Mots clés : Clones sains; Virus; Propagation végétative; Enracinement; Microgreffage; Microboutures; Ligneux; *In vitro*; *Citrus sp.*; Germination; Matériel végétal jeune; Matériel végétal âgé; Auxines