

Mise au point des conditions de calogénèse, caulogénèse et rhizogénèse chez les porte-greffes d'agrumes à partir d'épicotyle: cas du citrange Troyer

Benyahia, Hamid¹ ; Chetto, Ouiam¹, Dominique Dambier², Yann Froelicher³

¹ : Institut National de la Recherche Agronomique, INRA Maroc, CRRRA Kenitra, BP 257, Kenitra, Maroc

² : Cirad, Umr Agap TA A-108/02, 34398 Montpellier Cedex 5, France

³ : Centre Inra/Cirad - Umr Agap - San Giuliano - 20230 San Nicolao, France

Corresponding author: hamidbenyahia2002@yahoo.fr

Original submitted in on 28th September 2012. Published online at www.m.elewa.org on 31st December 2012.

RESUME

Objectif : L'introduction des biotechnologies végétales dans le programme d'amélioration génétique des porte-greffes d'agrumes offre des outils de sélection *in vitro* précoce et de création par hybridation somatique, apportant de nouvelles opportunités dans l'exploration de la variabilité du germoplasme d'agrumes. L'objectif de cette étude est la mise au point d'un protocole d'induction de cal et de régénération de plantules *in vitro* chez le citrange Troyer. Les facteurs les plus importants qui influent sur la calogénèse et la rhizogénèse sont la nature de l'explant, la composition du milieu de culture et les conditions d'incubation.

Méthodologie et résultat : Des fruits mûrs du citrange Troyer sont lavés avec une solution d'hypochlorite de sodium à 12% pendant 10 à 12 minutes. Les graines sont aseptiquement extraites et placées dans des tubes contenant le milieu de germination MS. Des fragments d'épicotyles de 2 à 3 mm de longueur sont prélevés sur des plantules âgées de 4 à 5 semaines puis déposés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture solide de Murashige et Skoog 1962, additionné ou non de différentes combinaisons hormonales: acide 2,dichlorophenoxyacétique (2,4-D); acide naphthalène acétique (ANA); benzylaminopurine (BAP), kinetin (Kn) et acide gibbérellique (GA3) à différentes concentrations. Le pH du milieu est ajusté entre 5.6 et 5.7 et solidifié par de 8 g/l de bacto- agar. Les milieux sont autoclavés 15 minutes à une pression de 1.08kgcm². Pour l'induction de cals, les cultures sont incubées à l'obscurité à une température de 26°C et une hygrométrie de 70%. Pour la croissance des cals, des fragments de cals sont placés dans le milieu MS additionné de différentes combinaisons hormonales. Les boîtes sont incubées à l'obscurité et à la lumière à une photopériode J/N de 16/8. Pour la régénération des pousses, les fragments de cals sont placés dans le milieu MS contenant la BAP avec les concentrations 0.5, 1 et 2 mg/l ou la kinétine à des concentrations de 0.5, 1 et 2 mg/l. Pour l'induction de racines, les pousses sont placées dans le milieu MS/2, le milieu MS additionné de 1mg/l d'acide naphthalène acétique (ANA).

Les explants des épicotyles réagissent différemment en présence de différentes combinaisons hormonales. Des cals blanchâtres friables sont induits sur le milieu contenant le 2-4D. Le pourcentage élevé d'induction de cals friables a été observé sur le milieu contenant la combinaison 2-4D et BAP à des concentrations de 1 et 0.5 mg/l. La croissance la plus importante a été observée à l'obscurité et en présence de 2-4D. Par

contre, soumis à une photopériode de 16/8, les cals prennent un aspect brunâtre à huileux avec une faible croissance. Le pourcentage le plus élevé de régénération de pousses a été observé sur milieu MS comportant 1 et 2 mg/l de BAP. L'induction de racine a été favorisée sur le milieu MS avec 1 mg/l d'acide naphthalène acétique (ANA).

Mots clés : Citrus, porte-greffes, citrange Troyer, callogenèse, caulogénèse, rhizogénèse.

Abstract

Objective: The incorporation of new technologies such as *in vitro* selection and protoplast fusion methods into citrus improvement programs offers new opportunities to facilitate, expedite, and fully utilize germplasm. In citrus, the main factors influencing callus induction and somatic embryogenesis are the genotype, the composition of the culture medium and kind and stage of the explants. This work aimed to define callogenesis and plant regeneration protocols for citrange.

Material and methods: Fruits of Troyer Citrange were washed in water sterilized with sodium hypochlorite for 10±12 min. After 3-4 rinses in sterile distilled water, the seeds were aseptically inoculated into the culture medium for germination. Epicotyl explants (2-3 mm length) from 4 to 5-weeks-old germinated nucellar seedlings were inoculated in culture medium. Callogenesis induction was done by introducing epicotyl segments in MS medium. The basic nutrient medium of Murashige and Skoog (1962) was supplemented with various growth hormones, such as 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D); naphthalene acetic acid (NAA); 6benzyl amino purine (BAP), kinetin (Kn) and gibberellic acid (GA3) at different concentrations. The pH of the medium was adjusted between 5.6 et 5.7, and solidified with 8000 mg/L of Bacto-agar. The Media were sterilized at 1.08 kg cm² for 15 min and the cultures were incubated at a temperature of 26-28°C under 70% relative humidity. For callusing, cultures were kept in the dark. For callus growth, fragment of callus were plated in MS medium amended with different concentration of hormone. Incubation was made in dark condition or in a 16/8 hours photoperiod of light/dark.

Results and conclusion: The explants produced various responses within 15-20 days in the different types of tested media. White, friable, non-embryogenic calli were produced from cut ends of explants within 20 days in media with 2,4D. The highest callusing was seen in 2,4D and BAP combination at concentrations of 1 and 0.5 mg/L. High growth of callus was observed in M8 medium (2,4D+ BAP) at dark condition where as at photoperiod condition callus became brown and decrease in growth. The M8 can be used for callus induction and screening *in vitro*. After that the calli were used for shoot regeneration by transferring them to MS medium supplemented with only BAP at 0.5, 1 and 2 mg/l or kinetin only at 0.5, 1 and 2 mg /L. For rooting, shoot cuttings were cultured on MS medium, half strength MS salts and MS medium with 1 mg/l of naphthalene acetic acid (NAA). Maximum percentage of shoot regeneration was obtained on MS Medium in the presence of 1 and 2 mg of BAP. For rooting, maximum percentage of root regeneration was obtained on MS medium in presence of 1 mg/L of naphthalene acetic acid (NAA).

Key words: Citrus, rootstocks, callogenesis, caulogenesis, rhizogenesis

INTRODUCTION

L'amélioration des porte-greffes d'agrumes par la voie sexuée est généralement limitée en raison de la présence de la polyembryonie, du degré d'hétérozygotie élevé au sein de ce genre, du phénomène d'incompatibilité et de la longueur de la phase juvénile (Button and Kochba, 1977; Grosser et al., 1984; Gmitter et al., 1992). Cependant, l'introduction de nouvelles technologies, comme la

sélection *in vitro*, la fusion de protoplastes et la transformation génétique permettent d'envisager l'exploration de nouvelles voies pour la création des porte-greffes (Moore et al., 1992; Kaneyoshi et al., 1984; Pen et al., 1995; Grosser et Gmitter, 1990; Bordon et al., 2000). L'application de la technique de sélection précoce *in vitro* au stade cal vis-à-vis d'une contrainte biotique ou abiotique nécessite au

préalable la mise au point de condition optimale d'induction et de croissance des cals. L'emploi d'hormones telles que l'acide naphthalène acétique (ANA) etou la kinétine (Kn) peut induire une callogenèse sur les explants d'épicotyle de *Citrus reticulata*,(Gill et al., 1995) . Rahaman et al.,(1996) ont mis en évidence le rôle de la BAP et de la kinétine sur l'induction de cals pour plusieurs espèces du genre *Citrus*.. Begum et. al.,(2003) ont montré que chez *Citrus grandis*, le pourcentage le plus élevé de cals, induits à partir de fragments d'épicotyle, est obtenu sur le milieu de Murashige et Skoog (1962), contenant 1mg/l de Benzylaminopurine (BAP) et 5mg/l de l'ANA. Par contre, Shawkat et Bushramirza,(2006) ont constaté que l'addition de l'acide 2,4 dichlorophenoxy acétique (2-4D) à une concentration de 1,5 mg/l au milieu de Murashige et Skoog, (1962) induit le pourcentage le plus élevé des cals à partir de fragments de tiges et de racines chez le porte-greffe

Rough lemon. Ce comportement différentiel des espèces du genre 'Citrus', en termes de réponse aux régulateurs de croissance sur l'induction de cals, impose la recherche de conditions optimales pour chaque espèce. Cette étude préliminaire entre dans le cadre d'un programme d'amélioration de la résistance des porte-greffes vis-à-vis des contraintes abiotiques par application d'outils de biotechnologie végétale. Notre objectif est la mise au point de conditions d'induction et de croissance des cals du citrange Troyer ainsi que la régénération de plantule par embryogenèse somatique. Ceci nous permettra ultérieurement d'envisager la recherche de vitro-variants tolérants à l'alcalinité, à la salinité et au stress hydrique.. En outre, la mise au point d'une méthodologie de screening précoce *in vitro* de génotypes au stade cal vis-à-vis des stress abiotiques, permettrait de raccourcir la durée de sélection des porte-greffes d'agrumes.

MATERIEL ET METHODES

Le matériel végétal est constitué de semences d'un arbre de citrange Troyer de la collection des porte-greffes de l'INRA d'El Menzeh, Kénitra. 50 graines sont désinfectées par trempage dans une solution d'alcool 90% durant 10 min, suivi d'un rinçage à l'eau distillée. Les graines sont ensuite décortiquées puis trempées dans une solution d'eau de javel à 12 % pendant 25 mn puis rincées 5 x fois à l'eau stérile durant 2 minutes. Elles sont alors réparties dans des tubes à essai contenant 10 ml d'un milieu de culture solide de Murashige et Skoog (1962) de pH ajusté à 5,6 avant autoclavage. L'incubation est réalisée à l'obscurité et à une humidité relative de 70% pendant 22 jours à 26°C (Moreira-Dias et al.,2000).

Induction de cals : Des épicotyles de plantules âgées de 22 jours sont prélevés, découpés en fragments de 5 mm puis déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture de base de Murashige et Skoog, (1962) additionné de différentes combinaisons hormonales (Tableau 1). Cinq fragments sont déposés dans chaque boîte. L'incubation est réalisée à l'obscurité, à 26°C . Cinq boîtes de Pétri sont préparées pour chaque milieu de culture. Après 30 jours d'incubation, les observations ont porté sur deux paramètres : le pourcentage des cals induits et leur aspect.

Tableau.1 : Hormones additionnées au milieu de Murashige et Skoog, (1962).

Code du milieu	Hormones	Concentration en mg/l
M1	Acide 2,4 dichlorophenoxyacétique	2-4D (1)
M2	Benzylaminopurine	BAP (1)
M3	Acide gibbérellique	GA3 (1)
M4	Kinétine	Kn (1)
M5	Acide naphthalène acétique	ANA (1)
M6	ANA+Kn	ANA (1) + Kn(0,5)
M7	BAP+ANA	BAP (1) + ANA (0,5)
M8	2-4D + BAP	2-4D (1) +BAP(0,5)
M9	2-4D + Kn	2-4D (1) + Kn (0,5)

Croissance des cals : Le comportement des cals a été étudié sur les différents milieux. Des fragments de cals de 50 mg sont prélevés à partir des fragments d'épicotyles où les cals sont induits avec un taux élevé, puis déposés dans des boîtes de Pétri contenant les différents milieux utilisés pour l'induction des cals. Deux séries de cinq boîtes ont été préparées : L'une a été incubée à l'obscurité à 26°C et l'autre incubée à la photopériode 16/8 (J/N), pendant 40 jours. Les observations ont porté sur : - l'aspect des cals sur les différents milieux et conditions d'incubation; - la masse des cals (matière fraîche); - l'épaisseur des cals.

Régénération des bourgeons et de pousses de tiges: Des fragments de cals de 50 mg ont été prélevés, pour servir à la régénération des bourgeons et de jeunes pousses, à partir des milieux favorisant

une meilleure croissance des cals. Pour étudier la régénération des bourgeons et des pousses de tiges, des fragments de cals de 50mg sont prélevés sur le milieu qui a permis une croissance meilleure des cals, et sont placés dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu de culture de base additionné de différentes concentrations hormonales (Tableau 2). Pour le suivi de l'expérimentation, trois régimes d'incubation ont été pratiqués : a- Incubation continue en obscurité pendant 45 jours (Moreira-Dias *et al.*, 2000); b- Incubation sous des conditions de Photopériode pendant 45 jours (Moreira-Dias *et al.*, 2000) ; c- Incubation en obscurité continue (20jours) suivie d'un séjour en condition de Photopériode (25 jours). Pour chaque condition d'incubation les observations ont porté sur le taux d'apparition de bourgeons et de pousses de tiges.

Tableau 2 : Composition hormonale pour les milieux de régénération des bourgeons et des pousses de tiges.

Code du milieu	Combinaison hormonale	Concentration en mg/l
Mb1	BAP	0,5
Mb2	BAP	1
Mb3	BAP	2
Mb4	Kn	0.5
Mb5	Kn	1
Mb6	Kn	2

Rhizogénèse : Afin de suivre l'induction racinaire, les pousses de tiges obtenues, ont été transférées, dans 3 séries de 10 tubes contenant chacune les milieux de

culture suivants : milieux MS et ½ MS sans hormones, et MS additionné de 1mg/l d'ANA. L'ensemble est placé à l'obscurité à 26 °C.

RESULTATS

Induction des cals : Différents types de réponse des explants ont été observés après 10 et 30 jours d'incubation (Tableau3). Sur certains milieux de culture nous avons noté, en plus de l'induction des cals, le développement de racines et de pousses de tiges (Figure1, Figure 2), soit directement à partir des

feuilles soit indirectement à partir des cals. Ainsi, sur le milieu M6 caractérisé par la présence de l'ANA + Kn à des concentrations de 1 et 0,5mg/l nous avons noté la formation de racines à partir de cal selon une organogénèse indirecte.

Tableau .3 : Réponse des explants d'épicotyle sur différents milieux de culture

Milieu de culture	Réponse
M1 2,4D 5 (1)	Callogenèse
M2 BAP (1)	Tige
M3 GA3 (1)	Callogenèse
M4 Kn (1)	Callogenèse+tige
M5 ANA (1)	0
M6 ANA+Kn 1+ 0,5	Callogenèse et Rhizogénèse
M7 BAP+ ANA 1+ 0,5	Callogenèse + rhizogénèse directe et indirecte+tige
M8 2,4D+BAP 1+ 0,5	Callogenèse
M9 2,4D+Kn 1+ 0,5	Callogenèse

Sur le milieu M4 caractérisé par la présence de la kinétine, seule la formation de pousses de tiges selon un processus d'organogénèse directe à partir du fragment de feuille a été obtenue. Par contre, sur le milieu M7 contenant le BAP et l'ANA, nous avons noté la formation des cals, de racines et de tiges. Dans le milieu M5 caractérisé par l'ANA seul, les explants n'ont

donné aucune réponse. En termes de taille des cals, le milieu M8 a permis l'obtention des cals granuleux et volumineux par rapport aux autres milieux utilisés (Figure .1). L'analyse de la variance de la variable « pourcentage d'induction des cals » a montré l'existence d'un effet hautement significatif du facteur « milieu de culture ».

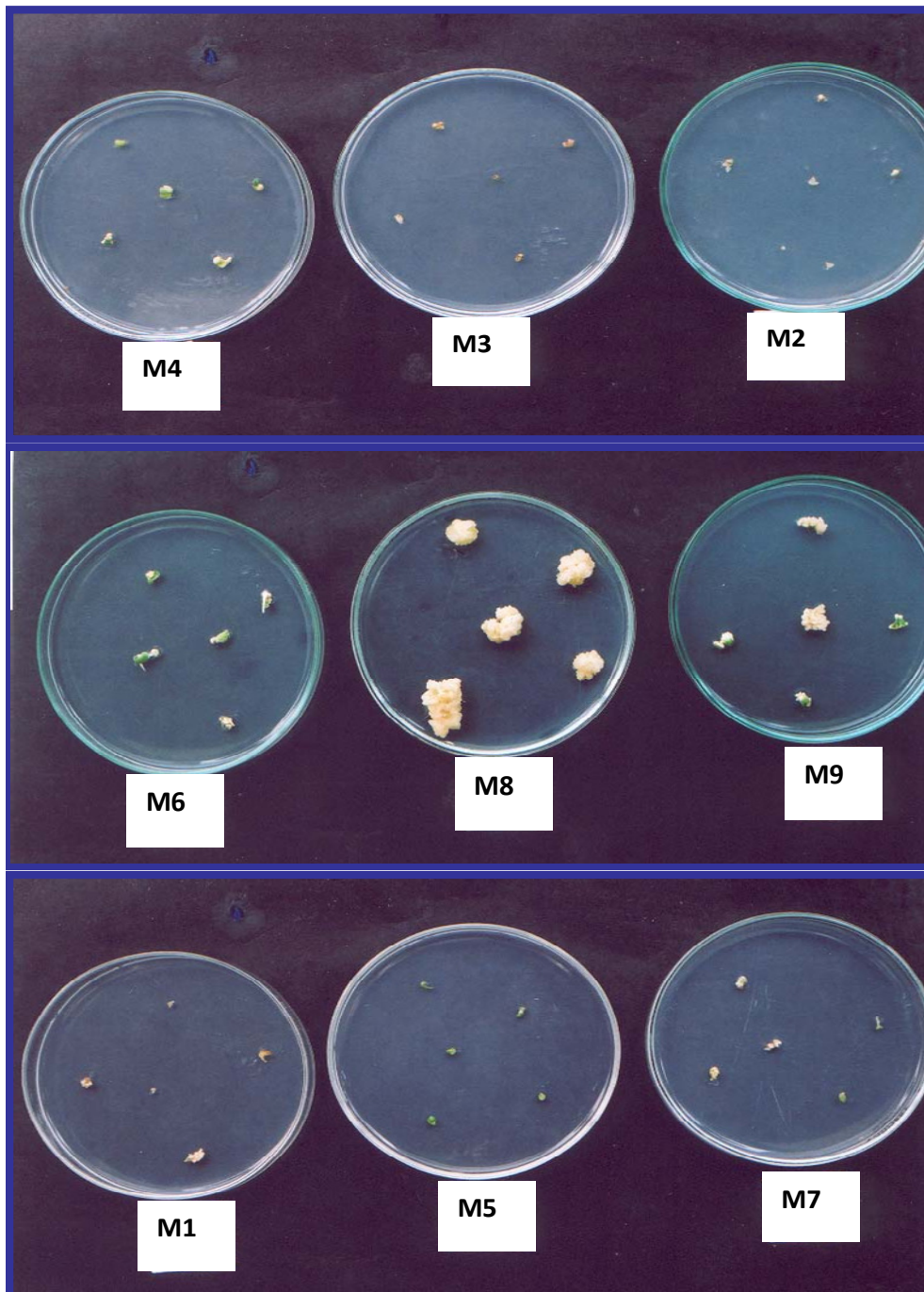


Figure .1 : Induction des cals sur différents milieux de culture.

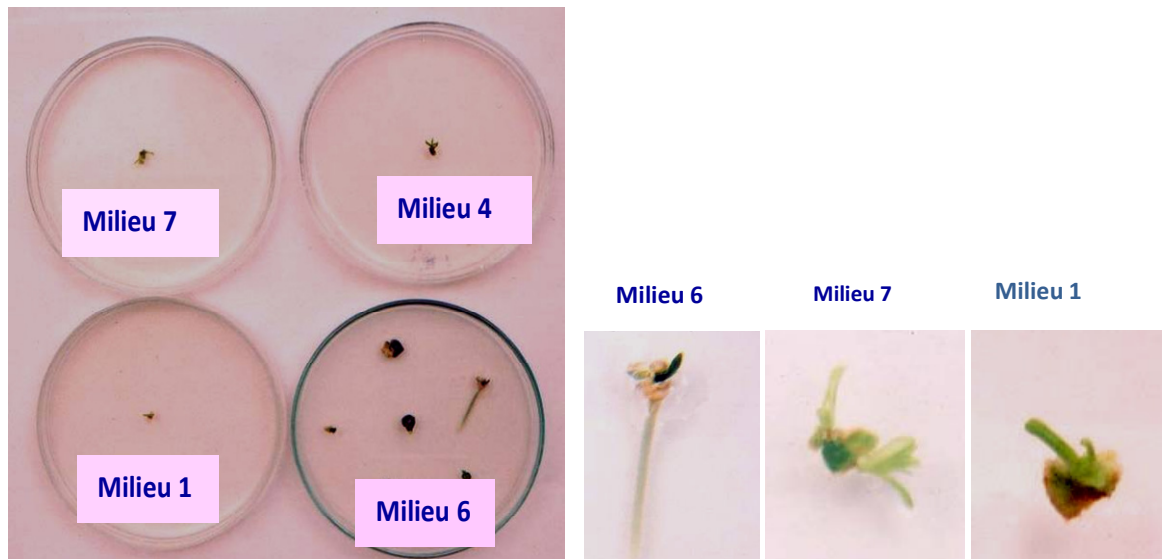


Figure .2 : Réponse des explants sur différents milieux de culture.

La comparaison des moyennes des pourcentages d'induction des cals a révélé quatre groupes qui diffèrent significativement (Figure. 3) :

Groupe 1 : contient les milieux M8 et M9 dont le pourcentage d'induction des cals est 100%.

Groupe 2 : comprend les milieux M1, M6 et M7. Le milieu M1 a permis un pourcentage d'induction de cals de l'ordre de 60%. Les milieux M6 et M7 ont permis

respectivement des pourcentages d'induction de cals de 73% et 71%.

Groupe 3 : composé des milieux M2, M3 et M4 qui ont donné lieu à des pourcentages d'induction des cals ne dépassant pas 20%.

Groupe 4. Contient les milieux Ms et M5 qui n'ont permis aucune induction des cals à partir de fragment de l'épicotyle.

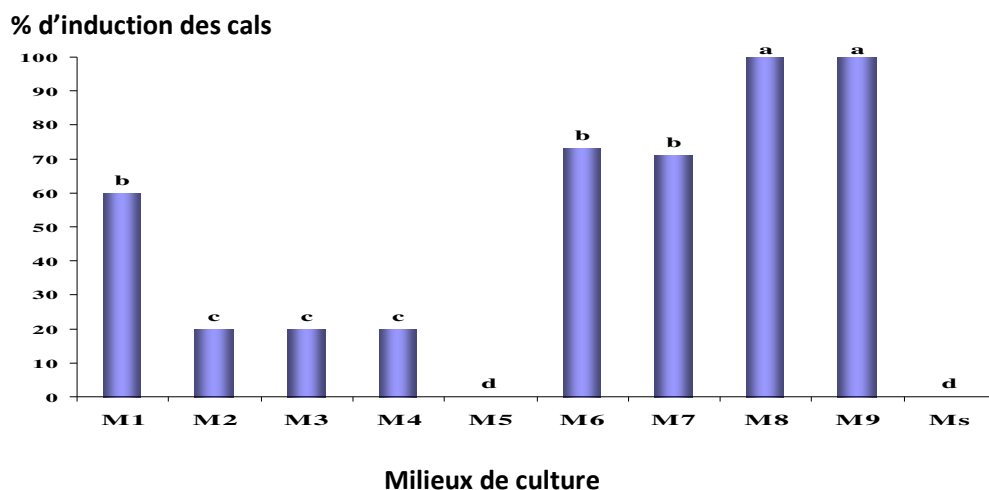


Figure .3 : Pourcentage d'induction des cals sur différents milieux de culture. Les milieux de culture suivis par une même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test de Duncan).

Croissance des cals sur différents milieux de culture

Aspect des cals : L'observation a été réalisée sur des cals provenant de milieux ayant donné les meilleurs scores en terme de pourcentage d'induction.. Ainsi, l'aspect des cals change en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation (Tableau. 4). En effet, l'incubation, dans le milieu M8 et à l'obscurité, donne des cals ayant une coloration jaune pâle et friable. Par contre,

cultivés en à la lumière, les cals prennent une coloration jaune- foncé à aspect translucide et huileux. Des constatations similaires sont notées à l'obscurité pour les milieux M6, M7 et M9. Mais en présence de la lumière, ces milieux favorisent l'apparition d'un brunissement des cals, sauf le milieu M7 qui a permis aux cals de prendre un aspect verdâtre avec apparition de bourgeons et de pousses (Figure. 4).

Tableau. 4 : Aspect des cals sur différents milieux de culture et différentes conditions d'incubation

Milieu	Obscurité	Photopériode
M6	Cals jaune pâles, granuleux ou friables	Cals brunâtres
M7	Cals jaunes pales, granuleux ou friables	Cals à aspect verdâtres avec apparition de bourgeons
M8	Cals jaune pâles, granuleux ou friables	Cals jaune foncé translucides à aspect huileux
M9	Cals jaune pâles, granuleux ou friables	Cals brunâtres



**M7
Obscurité**



**M 7
Photopériode**



**M8
Obscurité**



**M 8
Photopériode**

Figure 4: Aspect de cals sur différents milieux de culture testés et sous différentes conditions d'incubation.

Épaisseur des cals : L'épaisseur des cals varie considérablement en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation. En effet, les analyses statistiques de la variable épaisseur des cals ont montré des effets hautement significatifs des facteurs « milieu de culture, régime d'incubation » et l'interaction « régime d'incubation x milieu de culture ». A l'obscurité, la comparaison de la hauteur des cals a permis de distinguer deux groupes de milieux statistiquement différents (Figure. 5) : Le groupe 1 contenant le milieu M8, a induit l'épaisseur la plus importante sous des conditions d'obscurité (11mm). Le deuxième groupe comprend les milieux M6, M7 et M9. L'épaisseur des cals enregistrée sur

ces milieux de culture est de 5mm. Dans les conditions de photopériode, la comparaison des moyennes de l'épaisseur des cals enregistrée dans les différents milieux a montré que c'est le milieu M7 qui a permis la meilleure épaisseur des cals (8 mm), suivi par le milieu M8 (6mm) (Figure. 6). Le milieu M6 a donné l'épaisseur la plus faible (2 mm). Quel que soit le milieu de culture utilisé, l'épaisseur des cals en condition d'obscurité est significativement plus importante que celle enregistrée en condition de photopériode, à l'exception du milieu M7 où le phénomène est inversé (Figure. 6).

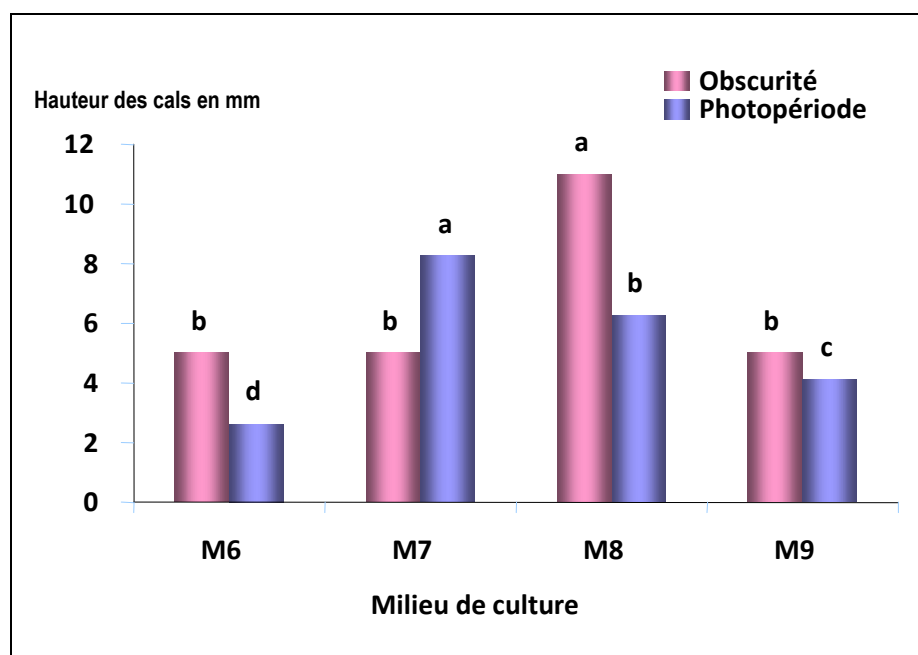


Figure 5 : Épaisseur des cals sous différentes conditions de culture. Pour un même milieu de culture, les régimes suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test de Duncan)

Matière fraîche des cals : La croissance des cals exprimée en matière fraîche, varie en fonction du milieu de culture et la condition d'incubation. Les analyses de la variance de la variable « biomasse fraîche des cals » ont montré des effets hautement significatifs des facteurs « milieu de culture, conditions d'incubation » et interaction « milieu de culture- condition d'incubation ». Ainsi, la comparaison des moyennes de la biomasse des cals, enregistrées à l'obscurité (Régime 1), montre que la matière fraîche est plus importante sur le milieu M8 par rapport aux autres milieux (3,6 g). (Figure. 6). En condition lumineuse (Régime 2), la

comparaison des moyennes de la biomasse des cals a révélé deux groupes significativement différents (Figure. 6). Le premier groupe comprenant les milieux M7 et M8 a permis une croissance importante. Il est suivi par un deuxième groupe formé par les milieux M6 et M9 qui n'ont permis qu'une faible croissance des cals. La biomasse fraîche enregistrée sur les milieux M8 et M6 à l'obscurité est significativement supérieure à celle enregistrée en photopériode (Figure. 6). Par contre, sur les milieux M7 et M9, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs des matières fraîches des cals cultivés à l'obscurité et à la lumière

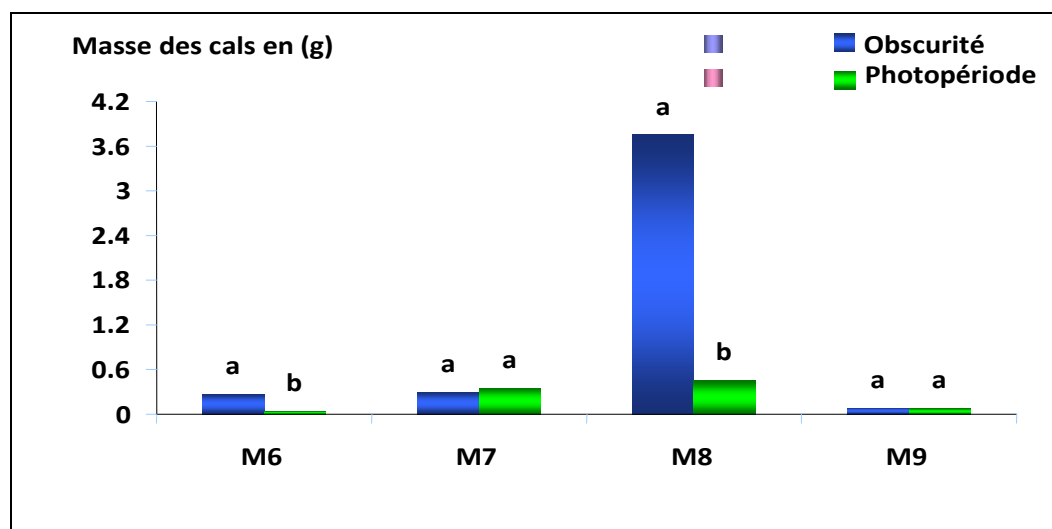


Figure. 6 : Masse des cals (matière fraîche) dans différentes conditions de culture. Pour un même milieu de culture, les régimes suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (test de Duncan).

Régénération des bourgeons et des pousses de tiges à partir des cals.

a. Obscurité continue : Dans des conditions d'obscurité continue, après 45 jours d'incubation nous n'avons observé aucun bourgeon ou pousse verte sur les différents milieux utilisés (Figure. 7). Par contre,

nous avons observé l'apparition d'ébauches blanchâtres de bourgeons sur les milieux Mb1, Mb2 et Mb3. L'analyse de la variance du pourcentage d'induction des d'ébauches blanchâtres de bourgeons à l'obscurité a révélé un effet hautement significatif sur la composition du milieu de culture.



Figure. 7 : Pousses de tige bien individualisées

La comparaison des moyennes du pourcentage d'induction des ébauches de pousses (Figure. 8) indique que le milieu Mb3 caractérisé par la présence du BAP à une concentration de 2 mg, est le milieu le plus efficace pour l'obtention des ébauches de pousses, suivi par le milieu Mb2 avec un pourcentage d'induction de 60% et le milieu Mb1 avec un pourcentage de 33%. Cependant, nous avons noté l'absence totale d'ébauches de pousses sur les autres milieux de culture contenant de la kiné tine.

b. Obscurité continue suivi d'un séjour sous des conditions de photopériode : L'incubation à

l'obscurité durant 30 jours suivie d'une période de 15 jours en photopériode a conduit à l'apparition de bourgeons et de pousses bien individualisés sur les milieux MB1, MB2 et MB3 (Figure. 8). Le pourcentage de régénération le plus élevé est enregistré sur les milieux Mb2 et Mb3 contenant le BAP respectivement à des concentrations de 1 et 2 mg/l. les taux enregistrés sur ces milieux sont respectivement 66 et 100% (Figure. 7). Sur les autres milieux, les cals n'ont rien donné tout en manifestant un phénomène de brunissement. L'incubation des tubes avec des fragments de cals à la lumière, photopériode 16/8 a

permis la régénération des bourgeons et des pousses de tiges sur les milieux Mb1, Mb2 contenant le BAP à des concentrations respectives de 0,5 et 1 mg. Les pourcentages les plus élevés sont enregistrés dans les milieux Mb2 soit 100% (figure 8). Le milieu Mb3

contenant 2mg/l du BAP ne diffère pas significativement des milieux contenant la kiné tine. Dans ces milieux aucune régénération de pousses n'a été observée.

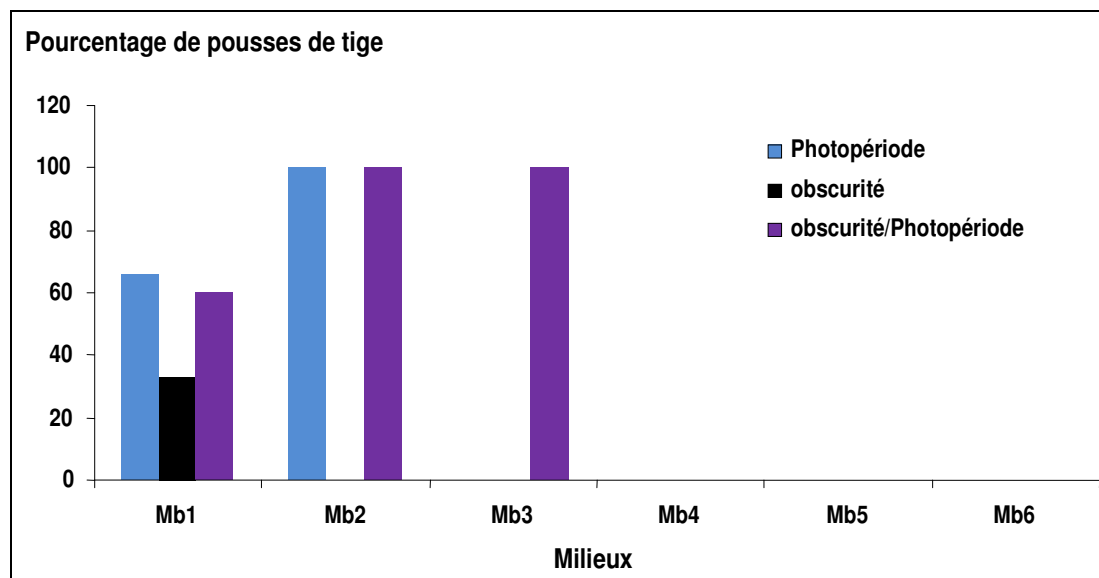


Figure 8 : Effet du milieu de culture et le régime d'incubation sur l'induction de pousses de tige à partir de cal.

Rhizogénèse : Après vingt jours d'incubation, les font apparaît que le développement racinaire est initié à partir de la tige du citrange Troyer (Figure. 10). Le pourcentage d'induction des racines le plus élevé a

été observé avec des milieux contenant de l'ANA. Le milieu MS à une demie-concentration permettait également, mais dans une moindre mesure la formation de racines.



Pousse de tige
Après 20 jours d'incubation



Début d'induction de racine
Après 20 jours d'incubation



Jeune plantule
Après 40 jours d'incubation

Figure 9 : Induction de racine à partir de pousses de tige

DISCUSSION

Cette étude avait pour objectif de définir des conditions optimales d'induction et de croissance des cals du citrange Troyer, notamment la composition du milieu de culture et les conditions d'incubation. En effet, Smirnov et Smirnova, (1986), ont rapporté que la capacité de formation des cals est déterminée génétiquement, mais qu'elle est exprimée sur un milieu nutritif spécifique. Dans notre étude, la culture

de fragments d'épicotyles a mise en évidence diverses réponses en fonction de la nature des hormones présentes dans le milieu de culture. En effet, on observait soit l'induction seule des cals soit la formation de pousses et de racines, par organogénèse directe ou indirecte. La formation de pousses de tiges par organogénèse directe sans apparition du stade cal a été aussi signalée chez le

citrange Carrizo par Moore et al., (1992) et chez *Citrus aurantifolia* par (Perez-Molphe-Balch et Ochoa-Alejo, 1997). D'autres auteurs ont noté chez ces espèces la formation de pousses de tiges uniquement selon un processus d'organogénèse direct (Raj-Bhansali et Arya, 1978; Barias et Skene, 1986; Edriss et Burger, 1984; Moore, 1986; Duran-Villa et al., 1989). Il est admis que les besoins hormonaux pour l'organogénèse des Citrus diffèrent d'une espèce à l'autre (Duran-Villa et al., 1989; Ghorbel et Duran-Villa, 1998) et que l'action de l'hormone dépend des conditions d'incubation, en particulier la présence ou l'absence de lumière (Moreira-Dias et al., 2000). Nous avons constaté également que les pourcentages élevés d'induction des cals sont enregistrés en présence du milieu M8 contenant le 2,4 D à 1 mg/l et BAP à 0,5 mg/l, le milieu M9 contenant le 2-4D à 1 mg/l et la kinétine à 0,5 mg/l. Chez *Citrus acida*, Bipasha et Goswami (1999) ont noté des pourcentages élevés de callogenèse sur des milieux identiques au milieu M8. Par contre, Shawkat et Bushramirza (2006) ont enregistré chez le limettier Rough lemon le pourcentage de cals le plus élevé en présence du 2-4D seul. En outre, chez l'oranger doux (*Citrus sinensis*,) le pourcentage élevé d'induction des cals a été obtenu sur le milieu de Murashige et Skoog additionné de 2-4D à 1 mg/L (Das et al., 2000). Bien que chez Rough lemon, l'incorporation du 2-4D, dans le milieu, donne le pourcentage d'induction des cals le plus élevé (Shawkat et Bushramirza, 2006), notre étude a révélé que la présence de cette hormone seule est à l'origine d'un faible taux d'induction des cals. Des résultats similaires ont été notés par Bipasha et Goswami (1999) chez *Citrus acida*. Ainsi, le pourcentage élevé des cals constaté par Shawkat et Bushramirza, 2006), pourrait être expliqué par la forte concentration du 2-4D utilisé par ces auteurs (1,5 mg/L) ou par un comportement différentiel des espèces d'agrumes vis-à-vis des hormones. En présence de l'ANA seul, à la concentration de 1mg/L, l'induction des cals est nulle. Par contre, chez *Citrus reticulata*, l'ANA et la kinétine peuvent induire une callogenèse sur les explants (Gill et al., 1995). DAS et al., (2000) ont enregistré chez *Citrus sinensis* un fort pourcentage d'induction des cals en présence de l'ANA à 1 mg/L. Il ressort également de notre étude que la croissance des cals, exprimée en matière fraîche ou en épaisseur de cal, est plus importante à l'obscurité qu'à la lumière, plus particulièrement sur le milieu M8 caractérisé par la présence du 2-4D et le BAP. Bipasha et Goswami (1999), ont indiqué que l'obscurité améliore l'induction et la croissance des cals de *Citrus acida*. D'après Moreira-Dias et al.,

(2000), la taille des cals du citrange Troyer est maximale à l'obscurité, alors que l'incubation en lumière réduit la croissance des cals. Rahaman et al., (1996) ont montré que la callogenèse de différentes espèces du genre Citrus est favorisée par la présence du BAP et de la kinétine. Le 2-4D, en combinaison avec la kinétine, a permis d'obtenir également des taux plus ou moins élevés de callogenèse. Ce comportement différentiel des espèces de Citrus, en termes d'induction des cals, impose la recherche propre de conditions optimales pour chaque espèce. Nous avons observé également dans cette étude un développement d'ébauches de bourgeons cultivés à l'obscurité. Une fois exposés à la lumière (photopériode 16/8), ces ébauches donnent naissance à des pousses de tiges. Parallèlement, l'incubation directe des cals en présence de BAP p avec une même photopériode, (16/8), permettent la régénération des pousses alors que la présence de la kinétine inhibe le phénomène de régénération. Une forte aptitude de régénération en présence de lumière a été récemment observée par Moreira-Dias et al., (2000) pour l'organogénèse indirecte de l'épicotyle du citrange Troyer. Par contre, Duran-Vila et al., (1992) ont constaté que l'incubation à l'obscurité augmente la régénération indirecte à partir des entrenœuds chez le *C. sinensis*, par comparaison avec l'incubation à la lumière. Cette différence de comportement pourrait être attribuée à une différence génétique ou bien à des fluctuations entre protocoles expérimentaux. La régénération a été observée avec de faibles concentrations de BAP, de fortes concentrations conduisant à une inhibition totale du processus. Il est admis que la concentration maximale de BAP pour la régénération de pousses est comprise entre 4,4 et 17,6 M mais elle est également fonction de l'espèce (Ghorbel et al. 1998. ; Moreira-Dias et al., 2000). Concernant l'émission racinaire, nous avons constaté dans cette étude que les meilleurs résultats sont obtenus en présence d'ANA. Des résultats similaires ont été enregistrés dans le cas du *Citrus acida* par Bipasha et Goswami (1999), *C. sinensis* et *C. limona* par Barlass et Skene, (1982). Cette étude préliminaire réalisée sur le citrange Troyer, a permis de définir les conditions de culture favorables à l'induction et la croissance des cals et à la régénération de plantules. Ceci constitue une étape importante pour la mise en place d'un programme d'amélioration de porte-greffes d'agrumes aussi bien par vitro-variation que par fusion somatique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barlas, M., Skene, K.G.M., 1986. Citrus (citrus species) In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.1, Trees. Springer, Berlin, pp. 207-219
- Barlass M, Skene KGM. 1982. In vitro plantlet formation from Citrus species and hybrids. *Scientia Horticulturae* 17: 333±341
- Begum, F., Amin, M.N. Islam, S. Azad M.A.K and Rehman M.M. 2003. In vitro Plant Regeneration from Cotyledon-derived Callus of Three Varieties Pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osb.) *Journal of Biological Sciences* 3 (8): 751-759, 2003
- Bipasha, C, Goswami B., 1999. Plantlet regeneration from long-term callus cultures of *Citrus acida* Roxb. and the uniformity of regenerated plants *Scientia Horticulturae* 82 (1999) 159-169.
- Bordón, J, Guardiola, L., and García-Luis, A., 2000., Genotype affects the the morphogenic response in vitro of Epicotyl Segments of Citrus Rootstocks . *Annals of Botany* 86: 159-166, 2000.
- Button, J., Kochba, J., 1977. Tissue culture in the citrus industry. In: Reinert, J., Bajaj, Y.P.S. (Eds.), *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Springer, Berlin. pp. 70-92.
- Das, A., Paul, A.K., Chaudhuri, S., 2000. Micropropagation of sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) for the development of nucellar seedlings. *Indian J. Exp. Biol.* 38, 269–72.
- Duran-Vila, N., Ortega, V., Navarro, L., 1989. Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16, 123-133.
- Duran-Vila, N., Gogorcena, Y., Ortega, V., Ortiz, J., Navarro, L., 1992: Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb. Effect of temperature and photosynthetic radiations. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 29, 11–18.
- Edriss MH, Burger DW. 1984. In vitro propagation of Troyer citrange from epicotyl segments. *Scientia Horticulturae* 23: 159-162.
- Ghorbel R, Navarro L, Duran-Vila N. 1998. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73: 323±327.
- Gill, M.I.S., Singh, Z., Dhillon, B,S. And Gosal, S.S., 1995. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *Sci. Horti.* 63374 pp 167-174
- Gmitter FC, Grosser JW, Moore GA. 1992. Citrus. In: *Hammerschlag*.
- Grosser, J.W., Chandler, J.L., Pelosi, R.R., Cohen, M., 1994. In vitro micropropagation of seedless 'Cohen' citrange. *Proc. Flor. State Hort. Soc.* 106, 57-60.
- Grosser, J.W., Gmitter, F.G., 1990. Somatic hybridization of citrus with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. *HortSci.* 25, 147-151.
- Kaneyoshi, J., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Shigemoto, N., Doi, Y., 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Plant Cell Reports* 13: 541-545.
- Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, Lawrence SD, Kline K. 1992. Agrobacterium-mediated transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 11: 238-242.
- Moore GA. 1986. In vitro propagation of Citrus rootstocks. *HortScience* 21: 300-301
- Moreira-Dias, J.M., Molina, R.V., Bordzxlacute, N.Y., Guardiola, J.L., and Garczxlacute.2000. Direct and indirect shot organogenic pathways in epicotyls cuttings of Troyer citrange in hormone requirement and their response ti light. *Ann Bot* 85.pp 103-110
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with the tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15,pp. 473-497.
- Pen, a L., Cervera, M., Juaarez, J., Navarro, A., Pina, JA., Duran-Vila, N., Navarro L. 1995. High efficiency of Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of Citrus. *Plant Science* 104: 183±191
- Perez-Molphe-Balch, E and Ochoa-Alejo. 1997. In vitro plant regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis. *Hortscience.* 32(5):931-934.

- Rahaman, A.A.S., Nagaraju, V., Parthasarthy, V.S., 1996. Response of embryoids of certain citrus species to two cytokinins. *Ann. Plant Physiol.* 10, 45±49.
- Raj-Bhansali, R., Arya, H.C., 1978. Shoot formation in stem and root callus of *Citrus aurantifolia* (Christm.) 'Swingle', grown in cultures. *Curr. Sci.* 47, 775-776.
- Shawkat, A., Bushramirza 2006. Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. *Acta Bot. Croat.* 65 (2), 137–146,
- Smirnov, V.A., et Smirnova, V.V.1986. Genetic determination of callus formation in tomato. *Plant Breeding. Abstracts* 2294.56: 110-114