

# UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de biotechnologies

## MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Amélioration Des Productions Végétales

ESSAI DE REGENERATION DE QUELQUES VARIETES D'AGRUMES DE  
DIFFERENTS GROUPES PAR EMBRYOGENESE SOMATIQUE

Par

**Seyyid Ali MEDDAS**

Devant le jury composé de :

BENRIMA A.	Professeur	U Blida1	Présidente
BOUTEKRABT A.	Professeur	U. Blida1	Promoteur
BENFEKIH L.	Professeur	U. Blida1	Examinatrice
KHELIFI L.	Professeur	ENSA El-Harrach	Examineur
MEZIANE M	MCA	U.Chlef	Invitée

Juin 2015

## ملخص

تحتل زراعة الحمضيات مرتبة مهمة في الاقتصاد الزراعي الوطني، لكن تطورها بقي محدودا نظرا للعوائق الموجودة في إنتاج شتلات سليمة و ذات نوعية، في حين توجد تقنيات عصرية في إكثار النباتات و تطهيرها من الفيروسات, ومن بينها تكوين أجنة من خلايا جسمانية.

الهدف من تجربتنا هو تطبيق تقنية تكوين أجنة جسمانية لإيجابياتها ، لحماية إرث الحمضيات في الجزائر. فجربنا هذه الطريقة من الإكثار على ثلاث مجموعات مختلفة بستة نوعيات هي، ليمون : بني عباس, شمال أفريقيا, دلس و يوسفى : بلدية و برتقال : شموتي المحطة, الباي, مسكي, ملياح، أين غيرنا مكونات الوسط المغذي بزيادة هرمونات النمو: BAP ; 2.4 D و BAP + 2.4 D.

النتائج المتحصل عليها تبين أن الهرمون BAP هو الذي أعطى الكُنب الجنينية. أما فيما يخص المجموعات والنوعيات فإن مجموعة الليمون هي التي أعطت قدرة على تكوين الكنب و الأجنة ، و كذلك نوعية واحدة من البرتقال (شموتي المحطة) , ولم تعطي نوعية اليوسفي بلدية أية كُنب أجنة.

الكلمات المفتاح : الحمضيات، BAP، 2.4D ، تكوين أجنة جسمانية، فيروس

## RESUME

L'agrumiculture occupe une place très importante dans l'économie agricole nationale. Cependant, son développement reste confronté aux contraintes de production de plants sains et de qualité, Alors qu'il existe plusieurs techniques modernes de multiplication et d'assainissement, parmi eux, l'embryogénèse somatique.

L'objectif de notre travail est de réaliser la technique d'embryogénèse somatique pour ses avantages, en vue de préserver le patrimoine agrumicole algérien. Pour cela, nous avons essayé ce type de multiplication sur trois groupes différents avec six variétés, à savoir ; les citronnier : Beni Abbes, Afrique du Nord, Dellys, le Mandarinier : Mandarine de Blida, et les orangers : Shamouti de Station, Meski, Bey et Miliah. Où nous avons varié la composition de milieu de culture avec adjonction d'hormone de croissance ; BAP seul, le 2.4D seul et une combinaison BAP + 2.4D.

Les résultats obtenus, montrent que l'hormone de croissance qui a permis l'obtention des cals embryogènes est le BAP. Au niveau des groupes et des variétés, le groupe des citronniers présente la meilleure aptitude à la callogénèse et l'embryogénèse, puis vient le groupe des orangers avec une seule variété (Shamouti de Station), et en fin le mandarier de Blida qui n'a donné que des cals non-embryogènes.

*Mots clés : agrumes, BAP, 2.4D, embryogénèse somatique, Virus*

## **ABSTRACT**

The citrus culture takes an important place in the national agricultural economy. Whereas, her development remain confronted on constraint with production of free and high quality plant. So, there are several modern techniques of multiplication and cleansing, among them, the somatic embryogenesis.

The objective of our work is to practice this technique for their avantages, with a view to preserve the Algerian citrus heritage. For that, we try this methode of multiplication on three different groups with six varieties; lemon: Beni Abbes, Afrique du Nord, Dellys, Mandarin: Mandarin of Blida, Orange: Shamouti de Station, Meski, Bey and Miliar. And we varied the growth regulators composition of the medium culture; BAP, 2.4 D and BAP+2.4D.

The obtain results show that the hormone who developed embryogenic callus is the BAP. And the group of lemon present the better aptitude of callogenesis et embryogenesis, then, come the group of orange with one variety (Shamouti de Station), and in the end, the mandarin of Blida give no embryogenic callus.

*Keywords: Citrus, BAP, 2.4D, somatic embryogenesis. Virus*

## REMERCIEMENTS

Tous d'abord nous voulons remercier **Dieu** tout puissant de nous avoir permis de réaliser ce modeste travail, puis nous remercions notre promoteur **Pr. BOTEKRABT Ammar** pour sa patience et ses orientations qui nous ont guidées tout au long de notre travail.

Nous remercions **Pr. BENRIMA A** d'avoir voulu présider le jury.

Nous remercions vont également aux membres du jury d'avoir voulu examiner notre travail, **Pr. KHELIFI L et Pr. BENFEKIH L.**

Aussi nous remercions la co-promotrice **Mm. Meziane M, Mm. HADDAD N, BOUKHALFA S et Mm RADJI H** et l'e personnel du laboratoire centrale de l'ITAFV sans exception.

Nos remerciements vont à monsieur Le Directeur générale de l'ITAFV **Mr MANDIL M** et le Directeur de la station centrale **Mr ALALGA Y** et à toute l'équipe de La station centrale.

Nos remerciements vont également au personnel du département d'agronomie pour leur aide, leur soutien et leurs conseils.

Nos remerciements vont aussi à tous qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail.

## DEDICACE

Je dédie ce travail à :

- Mes **parents** qui m'ont soutenu tout au long de cette épreuve et sans qui je ne serais jamais arrivé à ce stade ;
- Mes frères **Abd elkader, Mohamed, Hamza** et **Azzeddine** ;
- Ma chère sœur **Nafissa** ;
- A tous mes amis et collègues sans exception.

Seyyid Ali

# TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION

## CHAPITRE 01 : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1 Généralités sur les agrumes

1.1.1 Historique .....	17
1.1.2 Classification botanique.....	17
1.1.3 Caractères botaniques du Genre Citrus.....	18
1.1.4 Description de la floraison.....	19
1.1.5 Le fruit.....	19

### 1.2 Importance économique

1.2.1 Dans le monde.....	21
1.2.2 En Algérie.....	22

### 1.3 Techniques de multiplication des agrumes

1.3.1 Méthodes conventionnelles.....	25
1.3.1.1 Multiplication sexuée (le semis) .....	25
1.3.1.2 Multiplication asexuée traditionnelle (végétative) .....	25
1.3.2 Méthodes modernes de multiplication <i>in vitro</i> .....	25
1.3.2.1 la culture de méristème.....	26
1.3.2.2 . la caulogénèse.....	26
1.3.2.3 . le microgreffage <i>in vitro</i> .....	27
1.3.1.4 l'embryogénèse somatique.....	27

### 1.4 L'embryogénèse somatique

1.4.1 Définition.....	28
1.4.2 Origine et développement des embryons somatiques.....	29
1.4.3 Intérêt de l'embryogénèse somatique.....	33

1.4.4	Phases d'apparition d'embryons somatiques.....	34
1.4.5	Régulateurs de croissance .....	34
1.4.6	L'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et du stigmate.....	37
1.4.7	Les principales étapes de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et de stigmate.....	38
1.4.8	Les principaux facteurs influençant l'embryogenèse somatique.....	39
1.4.8.1.	Le milieu de culture.....	39
1.4.8.2 .	La nature et l'état de l'explant.....	39
1.4.8.3 .	Les régulateurs de croissance.....	40
<b>1.5</b>	<b>Importants problèmes phytosanitaires des agrumes</b>	
1.5.1	La Tristeza .....	41
1.5.2	Psorose écailleuse .....	42
1.5.3	Stubborn des agrumes .....	43
1.5.4	Exocortis.....	44
1.5.5	Impietratura.....	44
1.4.6	Cristacortis.....	45



## **CHAPITRE 02 : MATERIEL ET METHODES**

2.1 Origine du matériel végétal.....	47
2.2 Technique de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate....	49
2.2.1 Préparation du milieu de culture.....	49
2.2.2 Préparation de l'explant.....	50
2.2.3 La mise en culture de style et du stigmate.....	51
2.2.4 Incubation et subculture.....	52
2.2.5 Régénération de plantules.....	52
2.2.6 Greffage des plantules.....	53
2.2.7 Acclimatation des plants greffés.....	54
2.2.8 Les facteurs étudiés.....	54
2.2.9 Evaluation des résultats.....	56
2.2.10 Analyse statistique des résultats.....	56

## **CHAPITRE 03 : RESULTATS ET DISCUSSION**

3.1 Durée de déclenchement de la callogénèse des explants.....	58
3.2 Pourcentage des explants callés.....	59
3.3 Durée de la callogénèse.....	61
3.4 Importance des cals	
3.4.1 Groupe des citronniers et de Mandarinier.....	62
3.4.2 Groupe des orangers.....	63
3.5 Caractéristiques des cals selon les traitements hormonaux.....	64
3.6 Pourcentage d'embryons primaires par variété.....	67
3.7 Durée de déclenchement de l'embryogénèse.....	69
3.8 Nombre d'embryons primaires par Variété.....	70
3.9 Nombre d'embryons secondaires par Variété.....	71
3.10 Nombre d'embryons secondaires par embryons primaires.....	74

## **CONCLUSION**

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1</b> : Coupe verticale d'une fleur du genre <i>Citrus</i> .....	19
<b>Figure 1.2</b> : Production mondiale d'agrumes frais.....	21
<b>Figure 1.3</b> : Production d'agrumes en Algérie .....	23
<b>Figure 1.4</b> : Production de plants d'agrumes en Algérie.....	23
<b>Figure 1.5</b> : Schéma des deux types d'embryogénèse somatique.....	30
<b>Figure 1.6</b> : Embryon au stade globulaire.....	31
<b>Figure 1.7</b> : Embryon au stade cordiforme.....	32
<b>Figure 1.8</b> : Embryon au stade torpille.....	32
<b>Figure 1.9</b> : Embryon au stade cotylédonaire.....	33
<b>Figure 1.10</b> : Représentation schématique de la molécule de BAP.....	35
<b>Figure 1.11</b> : Représentation schématique de la molécule de 2.4 D.....	35
<b>Figure 1.12</b> : Représentation schématique de la molécule d'acide gibbérellique.....	36
<b>Figure 1.13</b> : Représentation schématique de la molécule de l'acide Abscissique.....	36
<b>Figure 1.14</b> : Etapes de l'embryogénèse somatique à partir de la culture de stigmate et style en <i>in vitro</i> .....	38
<b>Figure 1.15</b> : Différents symptômes provoqués par <i>Citrus tristeza Virus</i> .....	41
<b>Figure 1.16</b> : Symptômes de psorose sur arbre infecté.....	42
<b>Figure 1.17</b> : Symptômes de stubborn.....	43
<b>Figure 1.18</b> : Symptômes d'écailllements de l'écorce par <i>Citrus exocortis Viroïd</i> .....	44
<b>Figure 1.19</b> : Symptômes d'impetratura sur fruits.....	45
<b>Figure 1.20</b> : Symptôme de cristacortis sur mandarinier greffé sur bigaradier....	46
<b>Figure 2.1</b> : Boutons floraux des différentes espèces d'agrumes étudiées.....	48
<b>Figure 2.2</b> : Opération de coupe et mise en culture du style et stigmate .....	51
<b>Figure 2.3</b> : germination des embryons somatiques.....	52

<b>Figure 2.4 :</b> Plantules régénérées en tube à essai.....	52
<b>Figure 2.5 :</b> Mini-greffage <i>in vivo</i> des plantules régénérées pour acclimatation.....	53
<b>Figure 2.6 :</b> Plantules d'agrumes régénérées en phase d'acclimatation .....	54
<b>Figure 3.1 :</b> Durée de déclenchement de la callogénèse des explants.....	58
<b>Figure 3.2 :</b> Pourcentage des explants callés.....	60
<b>Figure 3.3 :</b> Durée de la callogénèse .....	61
<b>Figure 3.4 :</b> variation de l'importance des cals (groupe des Citronniers et Mandarinier).....	62
<b>Figure 3.5 :</b> variation de l'importance des cals (groupe des Orangers) .....	63
<b>Figure 3.6 :</b> Caractéristiques des cals selon les traitements hormonaux.....	65
<b>Figure 3.7 :</b> Explants des variétés après la mise en culture .....	66
<b>Figure 3.8 :</b> Cals de nature différente .....	66
<b>Figure 3.9 :</b> Pourcentage d'Embryons primaires par variété.....	67
<b>Figure 3.10 :</b> Cals embryogènes avec le milieu BAP.....	68
<b>Figure 3.11 :</b> Durée de déclenchement de l'embryogénèse.....	69
<b>Figure 3.12 :</b> Nombre d'Embryons primaire par variété.....	70
<b>Figure 3.13 :</b> Nombre d'Embryons secondaires par Variété.....	71
<b>Figure 3.14 :</b> Photos des embryons secondaires avec le milieu BAP.....	73
<b>Figure 3.15 :</b> Photos des embryons secondaires avec le milieu BAP.....	73
<b>Figure 3.16 :</b> Nombre d'embryons secondaires par embryons primaires.....	74
<b>Figure 3.17 :</b> Plantules régénérées .....	75

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.1</b> : Production mondiale de fruits et agrumes.....	22
<b>Tableau 2.1</b> : Différentes variétés d'agrumes testées durant l'expérimentation .....	48
<b>Tableau 2.2</b> : Composition des milieux de culture en macroéléments, microéléments et vitamines du milieu de base MURASHIGE et SKOOG (1962).....	49
<b>Tableau 2.3</b> : Dispositif expérimental des différents traitements .....	50

## LISTE DES ABREVIATIONS

PNDA : Plan national du développement agricole

FNDA : Fond national du développement agricole

CNCC : Centre national de certification et de conservation de plants et de semences

CTV : Citrus Tresteza Virus

ITAFV : Institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne

BAP : 6-benzylaminopurine

2.4D : l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

ANA : l'acide  $\alpha$ -naphtylacétique

THS : très hautement significatif

P : probabilité

## **LISTE DES ANNEXES**

**Annexe 01** : Durée de déclenchement de la callogénèse des explants

**Annexe 02** : Pourcentage d'explants callés

**Annexe 03** : Durée de la callogénèse

**Annexe 04**: Importance des cals

**Annexe 05** : Caractéristiques des cals selon les traitements hormonaux

**Annexe 06** : Pourcentage d'embryons primaires par variété

**Annexe 07** : Durée de déclenchement de l'embryogénèse

**Annexe 08** : Nombre d'embryons primaire par Variété

**Annexe 09** : Nombre d'embryons secondaires par Variété

**Annexe 10** : Nombre d'embryons secondaires par embryons primaires

## INTRODUCTION

Les agrumes présentent un intérêt vital pour un grand nombre de pays par leur importance économique, notamment les revenus appréciables qu'elles génèrent d'une part et d'autre part des emplois qu'elles occupent ainsi que les produits d'exploitation et de transformation en divers dérivés.

L'étendue de production d'agrumes s'explique par le fait que ces fruits sont appréciés aussi bien pour la consommation en frais que pour la transformation, surtout en fabrication de jus [1]. De plus, ils sont pourvus d'effets bénéfiques sur la santé, telles que la prévention des cancers et des maladies cardiovasculaires, et offrent de grandes qualités nutritionnelles [2].

De ce fait la production mondiale des agrumes ne cesse de se développer; elle atteint à 115 525,2 milliers de tonnes en 2011[3]. Les pays producteurs de l'hémisphère Nord représentent environ 70% de la production mondiale des fruits frais.

Aujourd'hui, un agrume sur deux commercialisés sur le marché international est méditerranéen [4]. L'Algérie, figure parmi les grands pays méditerranéens producteurs d'agrumes, avec une superficie de 64 766 Hectares [5]. En effet, elle est passée de 4 326 350 quintaux en 1999/2000 à 12 048 010 quintaux en 2012/2013 [5], une production relativement faible par rapport à l'importance de la superficie agrumicole. En effet, le rendement national moyen est de l'ordre de 20 T/ha [6]. Ce niveau est faible par rapport au potentiel d'une culture bien conduite et aux performances observées dans les pays agrumicoles du bassin méditerranéen qui atteint le double.

La réduction du potentiel productif des vergers agrumicoles est essentiellement due au vieillissement des arbres qui datent de l'époque coloniale, la dégradation de leur état phytosanitaire suite aux multiples attaques de ravageurs et différents agents pathogènes particulièrement virus et virus similaires.

Face à ces problèmes, et pour reconquérir sa place perdue sur le marché des agrumes, l'Algérie doit mettre en place une stratégie agricole visant à renouveler, multiplier, et améliorer le patrimoine agrumicole tout en assurant les bonnes garanties phytosanitaires.

L'emploi de matériel végétal sain au départ et le respect des filiations sanitaires permettent d'obtenir des plants vigoureux qui donnent une production en quantité et de bonne qualité, A cet égard, avant toute opération de multiplication, il faut passer par la phase d'assainissement et celle de sélection conservatoire.

Des techniques conventionnelles classiques (semis, marcottage, bouturage et greffage) et les techniques de culture *in vitro* dont la plus ancienne est la culture de la nucelle sont employées pour assainir et produire des plants en grande quantité. Cependant toutes ces techniques présentent des inconvénients telle que la difficulté dans l'assainissement des génotypes infectés par certains pathogènes et l'étalement du stade de juvénilité [7].

L'apport des biotechnologies dans le domaine de l'amélioration des agrumes, en particulier celles associées à l'embryogenèse somatique, ouvre aujourd'hui des perspectives très prometteuses pour apporter une solution aux grands problèmes que connaît l'agrumiculture [8].

L'embryogenèse somatique, particulièrement, celle obtenue à partir de la culture de stigmate et de style a été mise au point par CARIMI et *al.*, [9]. Cette technique a permis de régénérer des plants d'agrumes sains et génétiquement identiques à la plante mère [10]. C'est une voie de régénération très efficace dans l'élimination des maladies de dégénérescence dont le potentiel productif des plants produits est considérable.

Compte tenu des avantages qu'offre la technique de l'embryogenèse somatique dans la régénération et l'assainissement des agrumes, nous avons décidé de la tester sur des génotypes de différentes espèces d'agrumes algériens à savoir citronnier, oranger, mandarinier.

La réussite de cette entreprise contribuera sûrement à la préservation et à la valorisation de notre patrimoine agrumicole. L'intégration de la technique de l'embryogenèse somatique à partir du style et du stigmate dans les programmes d'assainissement et de certification des agrumes en Algérie permettra la production d'un matériel de propagation indemne et préformant dont l'utilisation contribuera à la relance de l'agrumiculture en Algérie.



# CHAPITRE 01 :

## RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1 Généralités sur les agrumes

#### 1.1.1 Historique

Le mot « agrumes », d'origine italienne, est un nom collectif, masculin pluriel, qui désigne les fruits comestibles et par extension, les arbres qui les portent, appartenant au genre *Citrus* [11].

Les agrumes sont originaires du sud-est asiatique dans le nord-est de l'Inde au Nord de la Birmanie. A partir de cette zone, la dispersion se serait effectuée vers l'est de l'Inde l'archipel Malais et la Chine du Sud [12]. Les européens ont découvert pour la première fois les agrumes à l'occasion de l'expédition d'Alexandre en Médie (dans les massifs montagneux d'Iran) au III<sup>ème</sup> siècle avant Jésus-Christ [13].

En Algérie, le bigaradier embellissait déjà pendant la période ottomane (du 16 au 18 siècle) les jardins des beys (Casbah, hauteurs d'Alger et Constantine), quant au mandarinier il fut introduit par M. HARDY en 1850 [14]. Au XIX siècle le Père clément de l'orphelinat agricole de Misserghin (Wilaya d'Oran), effectuant un croisement de mandarinier avec bigaradier découvrit la clémentine qui s'est avérée une variété précoce parmi un groupe de mandarines [15].

#### 1.1.2 Classification botanique

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées, et selon ARORA et RAO [16], leur classification généalogique est comme suit :

- Classe : Dicotylédone
- Ordre : Géraniale
- Famille : Rutaceae
- Sous Famille : Aurantioideae
- Tribu : Citreae
- Sous Tribu : Citrineae

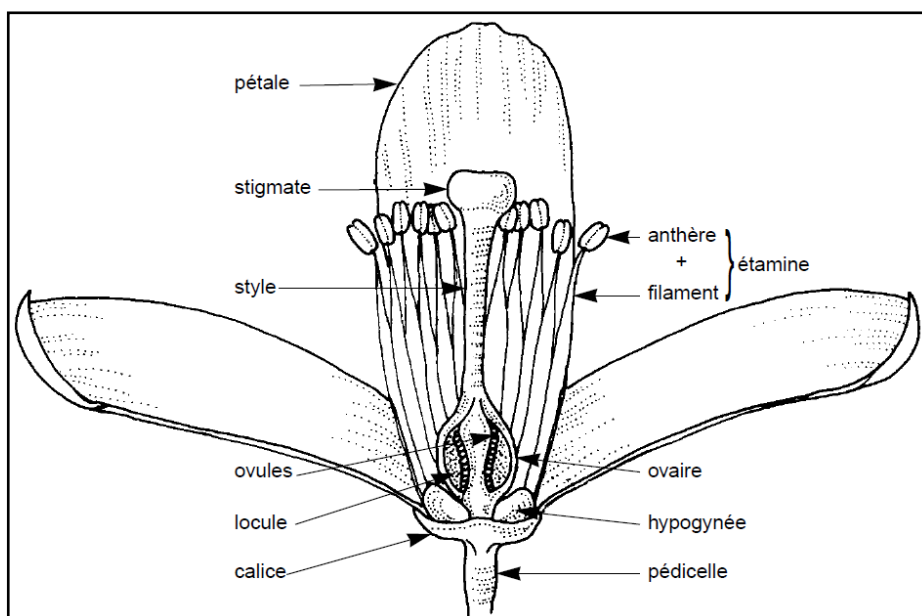
Les principales espèces d'agrumes implantées en Afrique du nord sont selon REBOUR [17]:

- *Citrus aurantium* (Linné): Oranger amer.
- *Citrus limon* (Linné): Citronnier.
- *Citrus paradisi* (Macferlane): Pomelo ou faux pamplemoussier.
- *Citrus reticulata* (Blanco): Mandarinier.
- *Citrus medica* (Linné): Cédratier.
- *Citrus aurantifolia* (Linné): Lime.
- *Citrus grandis* (Linné): Pamplemoussier.
- *Citrus margarita* (Lour): Kumquat.
- *Citrus sinensis* (Linné): Oranger doux.
- *Citrus clementina* (Clément): Clémentinier.

### 1.1.3 Caractère botanique du genre *Citrus* Linn.

SWINGLE [18], décrit les caractères distinctifs généraux du genre *Citrus*. Ce sont des petits arbres dont les jeunes rameaux sont cylindriques et épineux mais leurs branches âgées sont fréquemment inermes. Les feuilles sont persistantes, minces et non coriaces avec des veines principales peu nombreuses. Le pétiole plus ou moins ailé est articulé avec le limbe sauf dans le cas de l'espèce *C. medica*.

Les fleurs sont solitaires ou en petites grappes corymbiformes, parfaites ou mâles par avortement plus ou moins du pistil, calice à 4 ou 5 sépales, le nombre d'étamines est généralement quatre fois supérieur à celui des pétales et parfois 6 à 10 fois plus nombreux. L'ovaire est plus globuleux et bien distinct du style mince, ou tronqué, fusiforme ou subcylindrique passant progressivement à un style d'épaisseur voisine à celle de la partie supérieure de l'ovaire. Le style se termine brusquement en un stigmate subglobuleux ou en sphère aplatie [18], (Figure n°1.1)



**Figure n°1.1** : Coupe verticale d'une fleur du genre *Citrus*

#### 1.1.4 Description de la floraison :

Pour la plupart des *Citrus* cultivés, la floraison a lieu au printemps, de la fin mars au début mai, en même temps que s'effectue la pousse de printemps. Cependant, il faut signaler que, chez certaines espèces, les floraisons peuvent être échelonnées durant toute l'année : cas des limettiers, citronniers et des cédratiers. Le nombre de fleurs produit par un oranger adulte est estimé à 60 000. Mais seul un très faible pourcentage de ces fleurs donnera des fruits. Avec un taux de fructification de 1% (une fleur sur cent produisant un fruit), l'oranger produira 600 fruits ; à 200 g chacun, la récolte sera de l'ordre de 120 kg par arbre [11].

#### 1.1.5 Le fruit

Le fruit est formé de segments contenant des graines placées dans l'angle intérieur. Les segments sont entourés d'un endocarpe blanc à l'extérieur duquel se trouve une écorce à très nombreuses glandes à essence, devenant jaune ou orange à maturité. [19]

Les espèces et variétés commerciales bien connues des agrumiculteurs appartenant à ce genre sont décrites comme suit [19]:

- L'oranger (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

Selon PRALORAN [87], Plus de 1000 variétés sont recensées mais les plus cultivées sont classées en: Orange blonde «Washington Navel, Hamline, Salutiana, Valencia Late, Shamouti, etc...», Orange demi sanguine (la Maltaise demi sanguine ou Portugaise, la Double Fine, etc...)

- Le mandarinier (*Citrus reticulata* Blanco)

Parmi les variétés de cette espèce, on retiendra les «Tangerines» et la «Clémentine». Les taxonomistes modernes ont érigé au rang d'espèce *Citrus clementinia*. Les opinions sont partagées à propos de son origine. Selon PRALORAN [87], TRABUT et REBOUR rapportent qu'elle est créée en Algérie d'un croisement de mandarinier commun avec le bigaradier Granito.

- Le citronnier (*Citrus limon* L. Burn)

Le citronnier est un arbre vigoureux qui atteint une grande taille quand il est cultivé sous des conditions de milieu qui lui sont favorables. Les fleurs teintées de pourpre et groupées en bouquets, sont remontantes et de grande taille. Un certain pourcentage d'entre elles sont mâles en raison de l'avortement du pistil. Le citronnier craint le froid mais aussi les températures trop élevées. Les variétés les plus courantes sont : Eureka ou quatre saisons et Lisbon.

- Le bigaradier (*Citrus aurantium* L.)

Vulgairement appelé orange amère, le bigaradier est le plus résistant au froid, l'excès d'eau et à la gommose de *phytophthora*. Principalement pour ces qualités, il a été le plus important et le populaire des porte-greffes jusqu'à l'apparition de la Tristeza [87].

- Le pomelo (*Citrus paradisi* Macfayden)

Grapefruit en anglais, c'est la seule espèce qui ne soit pas originaire du Sud-Est asiatique car elle est apparue aux Antilles. Elle provient d'une mutation de bourgeon ou d'une hybridation du pamplemousse.

- Le pamplemoussier (*Citrus maxima* ou *Citrus grandis* L. Osbeck)

Bien que formant deux espèces différentes, le pamplemoussier et le pomelo sont assez étroitement apparentés et plusieurs auteurs considèrent

que le pomelo n'est qu'une sous espèce ou une variété botanique de *Citrus grandis*.

■ Le Cédratier (*Citrus medica* L.)

Les fruits de cette espèce sont habituellement de très grande taille et de forme oblongue terminée par un mamelon. Les pépins sont monoembryonnés. Le cédratier est la seule espèce d'agrumes qui se multiplie par bouturage. Les variétés les plus connues sont le Cédrat de Corse et le Cédrat diamante.

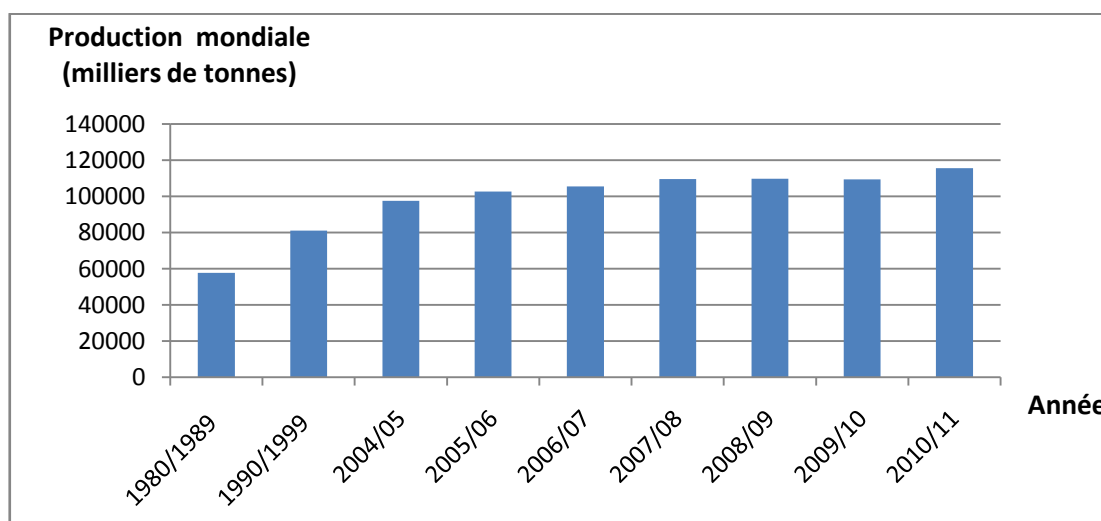
■ Le limetier (*Citrus aurantifolia* Swingle)

Les fruits très petits de couleur jaune verdâtre sont de forme sphérique à ovale et se terminent par un court mamelon. Ils présentent une peau lisse très mince à coriace et la pulpe juteuse. Les variétés les plus connues sont la Lime mexicaine appelée citron vert ou lime à petits fruits et la lime à gros fruits dont le type est la variété Bears.

## 1.2 Importance économique :

### 1.2.1. Dans le monde :

Les agrumes, représentent une des récoltes principales de fruit au monde durant ce siècle, avec une production annuelle moyenne de 115 millions de tonnes (Figure n° 1.2) [3].



**Figure n°1.2 :** Production mondiale d'agrumes frais (milliers de tonnes) [3]

La Chine et le Brésil sont les deux premiers producteurs d'agrumes dans le monde avec une production d'environ de 22 800 milliers de tonnes pour chacune et suivis par les Etats Unis d'Amérique avec une production de 10 445 milliers de tonnes (Tableau n°1.1) [20].

**Tableau n° 1.1** : Production mondiale de fruits et agrumes en millions de tonnes (mt) [21]

<b>Campagnes</b> <b>Espèce</b>	<b>2011/2012</b> <b>(mt)</b>	<b>2012/2013</b> <b>(mt)</b>	<b>Pays producteurs</b>
<b>Oranges fraîches</b>	53,61	51,29	Brésil, USA, Chine
<b>Mandarines et tangerines</b>	23,62	24,20	Chine, UE, Japon
<b>Pamplemousses</b>	5,62	5,24	Chine, USA, Afrique du sud
<b>Citrons et limes</b>	6,67	6,58	Mexique, Argentine, UE

Les oranges occupent la majeure partie du marché en raison de l'utilisation intensive par l'industrie de jus. Consommées en tant que produit frais, ils sont également employés dans la transformation des produits alimentaires industriels et domestiques (jus de fruit, parfum, huile essentielle...).

### 1.2.2 . En Algérie

Les statistiques du ministère de l'Agriculture [5] indiquent que le verger agrumicole algérien, en rapport, occupe une superficie globale de 57 474 hectares sur 64 766 hectares plantés.

La production agrumicole annuelle moyenne est toujours en augmentation (Figure n°1.3), elle est évaluée à 12 048 010 quintaux en 2013.

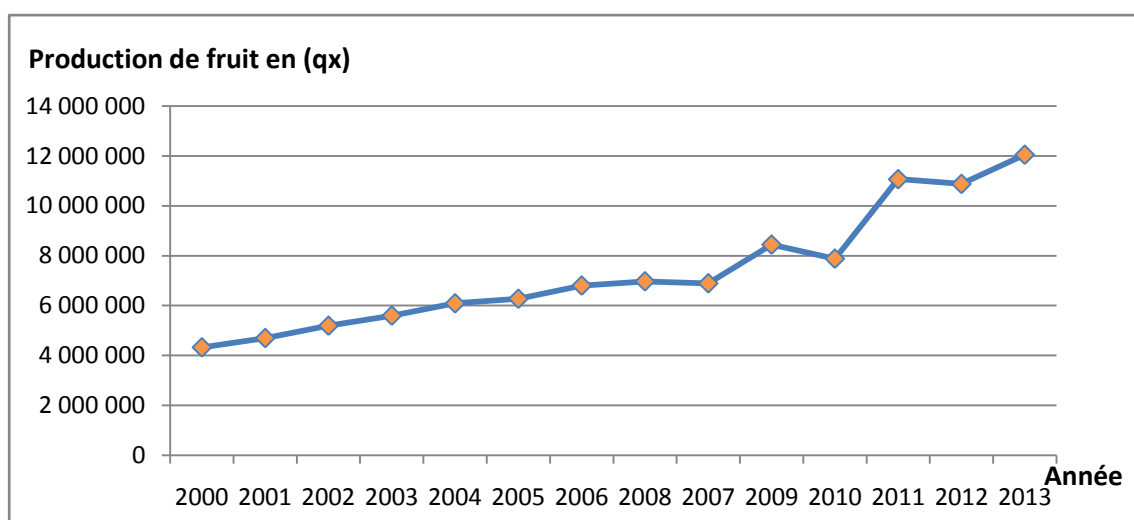


Figure n°1.3 : Production d'agrumes en Algérie (qx) [5]

L'absence de perspectives de développement agricole soutenu et d'une politique d'encouragement à l'agrumiculture pendant la décennie 1990 ont entraîné la baisse de l'activité de production de plants et par conséquent le nombre d'unités de productions.

Le lancement du Fonds national du développement agricole « FNDA » en 1995 puis du PNDA en 2000 ont stimulé la demande nationale en plants fruitiers y compris les plants agrumicoles. L'évolution de la production de plants à partir de 1999 est présentée dans la figure (1.4) :

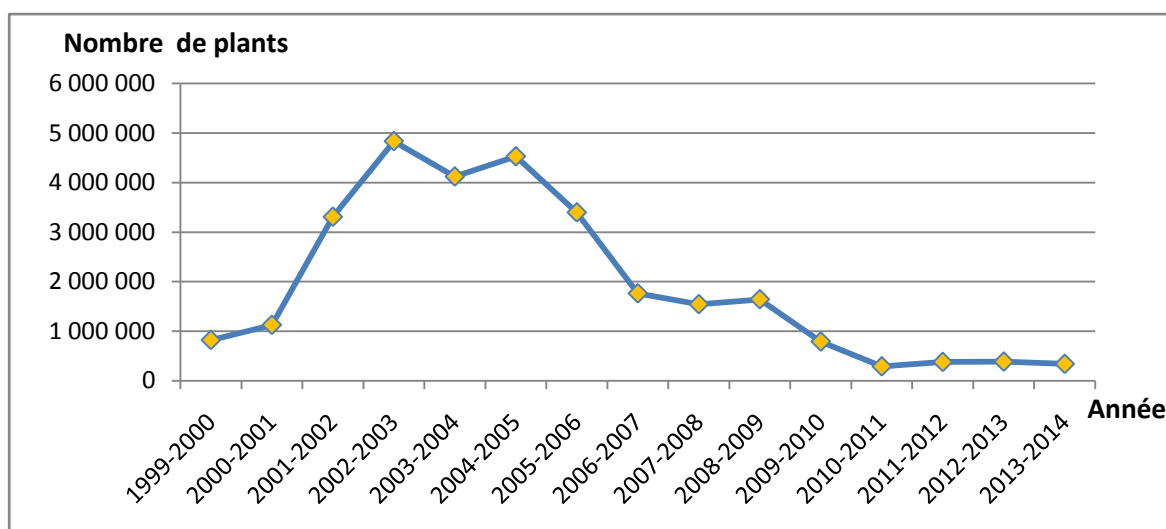


Figure n°1.4 : Production de plants d'agrumes en Algérie [22]

A la lumière du graphe de la figure n°1.4, la production de plants agrumicoles s'étalant de la campagne 1999/2000 à 2013/2014, nous constatons que la courbe est ascendante depuis 2000/2001, jusqu'à 2004/2005 où le nombre de plants contrôlés en végétation par les services de contrôle du CNCC ont révélé la production de plus de 3,3 millions de plants en 2001/2002, avant d'atteindre le pic de plus de 4,8 millions en 2002/2003, avant de subir une légère baisse en 2003/2004 et 2004/2005. En dépit de cette baisse peu significative, les résultats peuvent être considérés comme étant probants.

Une chute sensible a été, cependant, observée à partir de la campagne 2006/2007 avec une moyenne de 1,5 millions de plants et ce jusqu'à la campagne 2008/2009.

Cette chute libre a été observée par la suite allant jusqu'à atteindre une moyenne de 350 000 plants durant les campagnes 2011/2012/2013 et 2014 avec moins de 300 000 plants en 2010/2011.

Cette situation trouve sa justification par les motifs suivants :

- Absence de mesures de soutien adoptées au début de programme FNDA.
- Réduction des mesures incitatives par les pouvoirs publics.
- Problèmes liés à l'écoulement de la production, générés par :
  - L'introduction de nouvelles variétés par certains producteurs de plants au détriment de la production locale.
  - Absence de parcs à bois contrôlés, particulièrement après l'apparition de la TRISTEZA (maladie de dégénérescence, redoutable et susceptible de détruire une agrumiculture et ce compte tenu de la facilité de transmission du virus suscitée. D'autant que la maladie a été déclarée au niveau d'une zone agrumicole importante, à savoir la Wilaya de Blida, considérée comme étant le berceau de l'agrumiculture Algérienne. [23]



### 1.3 Techniques de multiplication des agrumes

#### 1.3.1 Méthodes conventionnelles

##### a. Multiplication sexuée (le semis)

La multiplication par semis est une tradition connue et pratiquée depuis longtemps par les agrumiculteurs, les plants issus de semis sont les meilleurs du point de vigueur végétative et résistance aux maladies et aux conditions agro-pédologiques [24].

Le semis est employé pour obtenir des nouvelles variétés ou des arbres francs pied ou porte greffes [25].

##### b. Multiplication asexuée traditionnelle (végétative)

Les méthodes traditionnelles de l'horticulture ou de l'arboriculture sont : le bouturage et le greffage.

Elles utilisent souvent une aptitude particulière de l'espèce à la propagation.

Le bouturage implique à l'inverse la séparation de la bouture avant son enracinement. Lorsque la bouture possède un ou plusieurs bourgeons le principal problème d'organogenèse posé par le bouturage est la rhizogénèse. Lorsqu'il s'agit d'un fragment de tige ou de racine dépourvu de bourgeons, la bouture doit produire à la fois des méristèmes de tige et de racine, l'ordre d'apparition des deux sortes de méristèmes variant avec l'espèce.

Le greffage est un cas très particulier de multiplication végétative que nous n'envisagerons pas. Il permet en effet de multiplier le clone auquel appartiennent les greffons. Mais il exige un support végétal, le porte-greffe, provenant lui-même de semis, généralement [26].

#### 1.3.2 Méthodes modernes de multiplication *in vitro* :

La micropropagation *in vitro* consiste à reproduire des plantes semblables à la plante-mère, c'est le clonage végétal. [27]

Les techniques de micropropagation empruntent essentiellement deux voies,

- L'une qui utilise des tissus méristématiques (méristème ou apex de tige, bourgeons axillaires) potentiellement capables de donner suite, au développement normal, d'un individu est appelée microbouturage [28]. Cette technique est

souvent appelée "multiplication conforme" car elle part de méristème préexistant dans les quels les cellules sont génétiquement très stables AMATO in BOXUS [29], l'individu est généralement obtenu en deux étapes successives, d'abord la production de tige , puis son enracinement .

- L'autre voie, utilise toute sorte de tissus différenciés (fragments de tige, de racines, de pétiole, de feuilles, d'embryons matures et immatures, d'hypocotyles, cotylédons...etc) pour aboutir à la néoformation soit de bourgeons ou de racines, c'est l'organogenèse, soit de structures ressemblant aux embryons zygotiques, c'est l'embryogenèse somatique [30] [26].

### 1.3.2.1 La culture de méristème

Les méristèmes sont des zones de cellules à division intense, situés au cœur des bourgeons et des extrémités des racines [27].

La culture de méristèmes à conduit à des applications nouvelles, originales concernant le domaine du phytosanitaire, notamment pour l'éradication de nombreuses maladies (viroses, mycoses, mycoplasmoses, bactérioses) et a permis la régénération d'un grand nombre d'espèce saines. [31]

Pour les plantes porteuses de virus difficiles à éliminer, la culture de méristèmes peut être associée à la thermothérapie ou à la chimiothérapie [32].

Chez les *Citrus*, les tentatives de régénérer des plantes à partir de cultures de méristèmes ont échoué. Cependant, le greffage de dôme méristématique virosé sur des semis sains de sujets porte-greffes cultivés *in vitro*, a fourni des plantes microgreffées se développant exemptes des principaux virus ou viroïdes (Tristeza, Xyloporose, Exocortis) des *Citrus* [33].

### 1.3.2.2 La caulogénèse

La production spontanée de bourgeons adventifs est relativement rare, dans les conditions naturelles [26]. Un des apports de la technique des cultures *in vitro* associée dès son origine à l'emploi des régulateurs de croissance a été d'exploiter chez de nombreuses espèces la potentialité non exprimée de néo-former des bourgeons après dédifférenciation cellulaire poussée. Ce résultat provient essentiellement de l'utilisation d'associations équilibrées de cytokinines et d'auxines et de milieux minéraux adaptés (type milieu de MURASHIGE et SKOOG

[34]). Mais il s'appuie aussi le plus souvent sur le choix judicieux de l'organe et du tissu ainsi que sur celui du prélèvement : les tissus inflorescentiels manifestent parfois une plus grande aptitude à la régénération que les tissus végétatifs, les tissus superficiels sont souvent plus favorables que les tissus profonds, ...

#### 1.3.2.3 Le microgreffage *in vitro*

Le greffage de méristèmes ou d'apex réalisé dans des conditions aseptiques en culture *in vitro* a été envisagé dans deux perspectives :

- Reconstitution de plantes indemnes de virus dans des cas où la culture d'apex présente des difficultés (en particulier chez certains ligneux).

La méthode a été utilisée avec succès chez les *Citrus* [35], le Pêcher [36], le Pommier [37]. Dans ce dernier exemple, on greffe des apex provenant de pousses terminales de 2 à 3 cm de longueur prélevées à partir de jeunes arbres sur des plantules âgées de 15 jours décapitées à 1,5 cm au-dessus des cotylédons. Le rendement en pousses feuillées est d'environ 23 %.

- Reconstitution de clones à partir de plantes âgées inaptes au bouturage en raison des difficultés d'enracinement :

Le greffage d'apex de tige provenant d'arbres âgés sur des porte-greffes juvéniles a été utilisé plus récemment dans le but de provoquer un rajeunissement physiologique facilitant l'enracinement et le bouturage. Cette méthode peut être appliquée à d'autres espèces et pourrait probablement être plus largement employée dans l'avenir [26].

#### 1.3.2.4 L'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est une forme de multiplication végétative qui permet d'obtenir une multitude de plantules identiques génétiquement à la plante donneuse d'explants. Elle repose sur l'utilisation de régulateurs de croissance synthétiques (auxine) pour induire la dédifférenciation des tissus et la formation de tissus (cals) embryogènes. Le cal embryogène est le matériel de départ pour le développement des embryons, puis la réalisation de régénération de plantules [38].

## 1.4 L'embryogénèse somatique

### 1.4.1 Définition

La formation d'embryons à partir de cellules somatiques normales a été obtenue en culture *in vitro* chez la Carotte par REINERT [39] et STEWARD [40]. Puis chez un certain nombre d'espèces appartenant à des familles très diverses.

La formation d'un embryon ne peut donc plus être considérée comme l'apanage du zygote issu de la fécondation. Elle ne nécessite pas non plus l'environnement particulier que constitue l'albumen. Les embryons peuvent se développer à partir de cellules apparemment banales, diploïdes ou même haploïdes (dans le cas de « l'androgenèse »).

Cependant, il arrive souvent, à la lecture de certaines publications, qu'on ne sache pas très bien si les plantules régénérées proviennent de véritables embryons somatiques (ou « embryoïdes ») ou du développement successif d'un bourgeon et de racines [26].

En effet, après quelque temps, les deux types de productions ne peuvent plus être distingués. Mais l'embryoïde suit le même développement qu'un embryon normal en passant par les étapes décrites par l'embryogénèse classique : « stade globulaire », « stade en cœur », « stade torpille », etc.. Il est caractérisé par sa structure bipolaire avec développement concomitant d'un méristème de tige et d'un méristème de racine [26].

Le fait qu'un embryon ne soit pas nécessairement le produit de la fécondation a une portée biologique et fondamentale considérable. L'embryogénèse somatique a illustré le concept de la « *totipotence cellulaire* ». Toute cellule possède en effet dans son génome l'information nécessaire pour reconstituer une plante entière. Mais il semble bien qu'elle ne puisse le faire effectivement qu'à condition de n'être pas engagée trop loin dans le mécanisme de la différenciation et d'être placée dans un environnement approprié [26].

L'embryogénèse somatique paraît être la méthode théoriquement « idéale » de multiplication végétative. Elle devrait en particulier permettre d'utiliser, dans l'avenir, les résultats éventuels de manipulation au niveau cellulaire (mutagenèse, fusion de protoplastes, ...).

Malheureusement, la formation « d'embryoïdes », bien qu'elle ait été observée chez un certain nombre d'espèces appartenant à des familles diverses est

relativement exceptionnelle et sa généralisation paraît encore difficile. Le fait même que dans un premier temps, tous les résultats avaient été obtenus avec quelques familles privilégiées (Ombellifères, Solanacées) semble bien montrer qu'elle est probablement favorisée par des facteurs génétiques et tissulaires inconnus ou indéterminés [26].

Classiquement, l'embryon est défini comme étant une plante se trouvant au stade initial de son développement. Il s'agit en fait d'une structure bipolaire (munie de deux méristèmes : l'un caulinaire et l'autre racinaire) qui, suite au processus de germination, donne naissance à une nouvelle plante.

Habituellement, l'embryon s'édifie à partir d'une cellule initiale, le zygote, formé lors de la reproduction sexuée (embryon zygotique).

Cependant, d'autres types d'embryons peuvent également se développer à partir de cellules du sporophyte ou du gamétophyte, embryons qui ne sont pas le produit d'une fusion gamétique et qui sont appelés "embryons somatiques". Parfois, chez certaines espèces, ils résultent d'une embryogenèse somatique naturelle qualifiée d'apomixie. Dans certains cas en effet, les anthérozoïdes, l'oosphère, voire d'autres cellules gamétophytiques peuvent engendrer des embryons parthénogénétiques. Dans d'autres cas, certaines cellules sporophytiques localisées au niveau des tissus intra-ovulaire, en particulier le nucelle, fournissent naturellement des embryons apoméiotiques appelés aussi "embryons nucellaires". Ce type d'embryogenèse est très développé dans la famille des Rutacées, spécialement chez les Citrus [41] [42]. Toutefois, cette appellation est essentiellement appliquée, selon certains auteurs comme PIATTI [43] et MARGARA [26] aux embryons obtenus à partir de culture de tissus *in-vitro* du sporophyte.

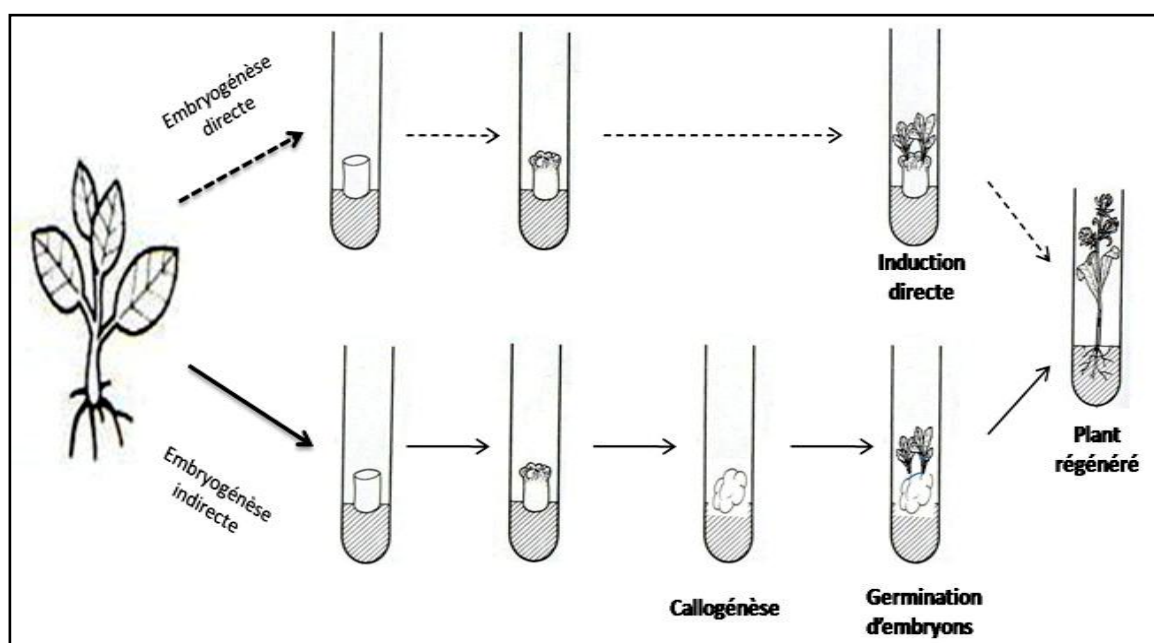
#### 1.4.2 Origine et développement des embryons somatiques

Selon KOMAMINE et *al.*, [44] le terme « cellule embryogène » doit être limité aux cellules qui ont achevé le stade de transition de cellule somatique au stade où aucun facteur stimulateur externe ultérieur n'est utilisé pour produire des embryons somatiques.

Les données cytologiques montrent que les embryons somatiques ont pour origine des cellules particulières; dites embryogènes. Elles présentent des caractères de cellules méristématiques primaires: petites tailles, cytoplasme dense, gros noyaux aux nucléoles proéminents et petites vacuoles.

Elles fixent de manière intense les colorants ce qui les rend aisément repérables en cytologie [45], [46], [47].

Deux voies pour l'embryogenèse somatique sont décrites (SHARP et *al.*, (1980) in PIATTI [42]) ( Figure n°1.5 ) :



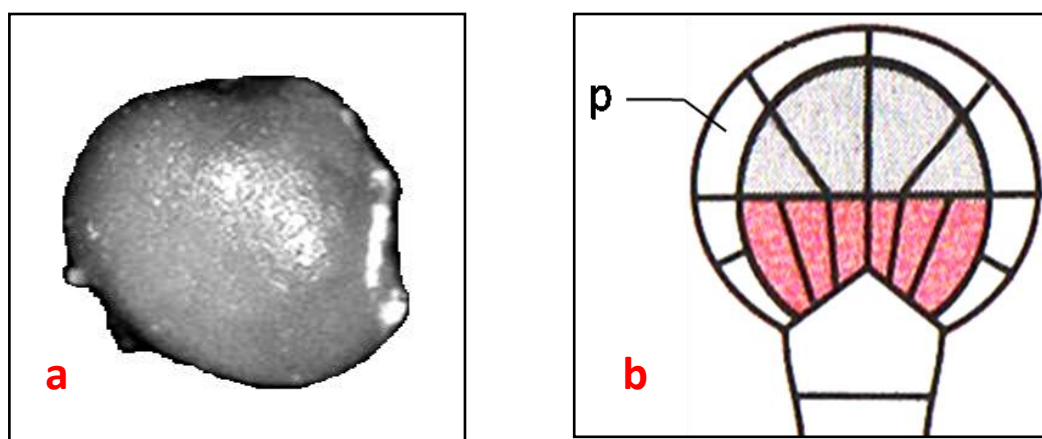
**Figure n°1.5 :** Schéma de l'embryogenèse somatique directe et indirecte.

La première est dite l'embryogenèse directe où les embryons sont initiés à partir de tissus en absence de prolifération de cal. Ceci se produit à partir des cellules pré-embryogéniques déterminées (P.E.D.C) où les cellules sont déjà engagées dans un développement embryogène et elles ont besoin seulement d'être libérées [43] [48]. Elles semblent préexister dans les tissus de certains explants comme les embryons immatures ou les fragments de très jeunes plantes [28].

La seconde dite est l'embryogenèse somatique indirecte, pour laquelle une prolifération cellulaire est requise. Les travaux de SHARP (1980) et d'EVANS (1981) in PIATTI [43] ont également pu servir à mettre en évidence, l'existence de cellules initiatrices qui sont déjà différenciées mais dépourvues de capacité

embryogènes. Ils les nomment des cellules pré-embryogènes indéterminées (PEIC). Les cellules embryogènes apparaissent tardivement au sein du cal produit par la réactivation mitotique des cellules différenciées et/ ou la prolifération des cambiums obtenus à partir d'explants de type racines, tige ou de feuille [45] [49]. Leur multiplication aboutit à la formation de groupes de cellules embryogènes "nodules méristématiques" dispersés, parmi les autres cellules du cal et qui sont généralement de type parenchymateux. A la suite de leur repiquage sur des milieux dépourvus d'auxines, ces nodules évoluent en des embryons somatiques comme c'est le cas chez la carotte [28].

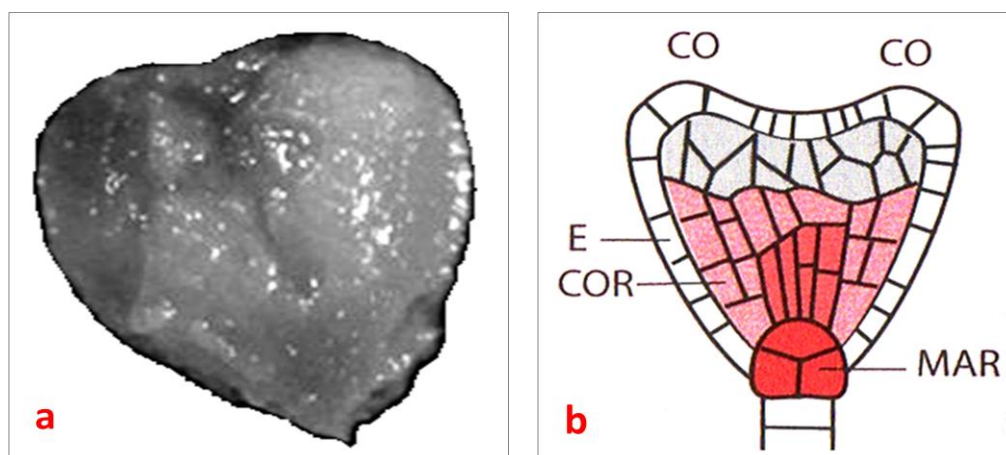
Les embryons somatiques connaissent les mêmes stades de développement morphologiques que traversent habituellement les embryons zygotiques à savoir : stade globulaire (Figure n°1.6), cordiforme (Figure n°1.7), torpille (Figure n°1.8) et cotylédonaire (Figure n°1.9) [50]. Ils ont une structure chromosomique souvent semblable à celle de la plante- mère dont ils sont issus [46]. Le critère qui permet de reconnaître un embryon somatique est certainement sa structure bipolaire, qui développe précocement et simultanément un méristème caulinaire et un méristème racinaire [51] [46] :



**Figure n°1.6 : Embryon au stade globulaire**

**a)** Embryon au stade globulaire [52] ; **b)** Schéma d'un embryon au stade globulaire[53]

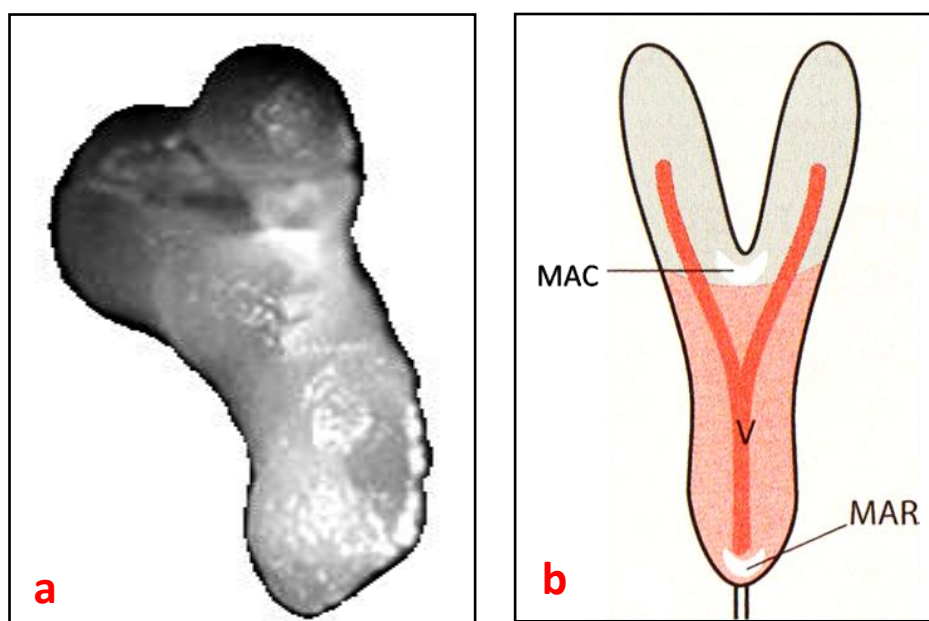
**P** : protoderme



**Figure n°1.7 : Embryon au stade cordiforme**

**a** : Embryon au stade cordiforme[52]; **b** : Schéma d'un embryon au stade cordiforme[53]

**CO** : primordia des cotylédons **COR** : cortex  
**E** : épiderme **MAR** : méristème apicale racinaire

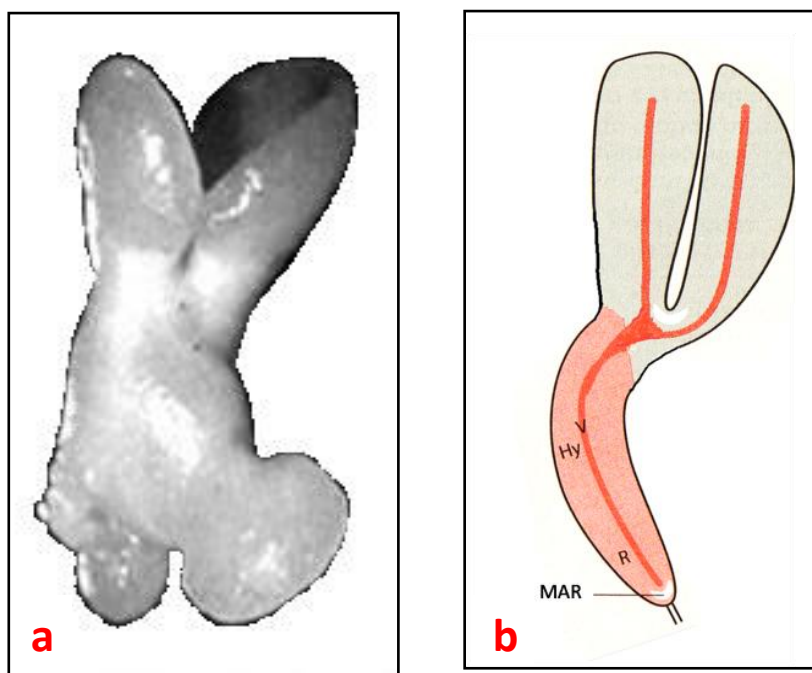


**Figure n°1.8 : Embryon au stade torpille**

**a)** Embryon au stade torpille [52]; **b)** Schéma d'un embryon au stade torpille[53]

**MAC** : méristème apicale caulinaire  
**MAR** : méristème apicale racinaire **V** : primordia vasculaire





**Figure n°1.9 : Embryon au stade cotylédonaire**

**a)** Embryon au stade cotylédonaire [52];

**b)** :Schéma d'un embryon au stade cotylédonaire [53]

**Hy** : hypocotyle **MAR** : méristème apicale racinaire  
**R** : racine **V** : primordia vasculaire

#### 1.4.3 Intérêt de l'embryogenèse somatique

Historiquement, les premiers embryons somatiques ont été signalés, en 1958, par l'équipe de REINERT et STEWARD sur des cultures du parenchyme libérien de racine de carotte [54]. Depuis et grâce au progrès spectaculaire que connaissent les techniques de cultures *in-vitro*, la production d'embryons somatiques est devenue possible chez un grand nombre d'espèces végétales.

Comparativement aux autres voies de multiplication végétative *in-vitro*, l'embryogenèse somatique se montre plus séduisante en terme de performance et d'efficacité [55] [43]. En effet, la maîtrise de la production d'embryons, chez certaines espèces, via les suspensions cellulaires permet d'obtenir des milliers d'embryons par litre de milieu de culture et par conséquent la régénération de milliers de plants. L'embryogenèse somatique permet aussi en un temps très court de produire des plantes entières sans passer par les contraintes que connaît

habituellement l'organogénèse (phase de caulogénèse et de rhizogénèse) [56] [48].

La voie de l'embryogénèse somatique est actuellement intégrée dans de nombreux schémas de sélection puisqu'elle permet de diminuer sensiblement la longueur des cycles d'amélioration comme par exemple le temps nécessaire à la valorisation du matériel sélectionné âgé ou juvénile ou la production de parents hybrides nécessaires à la diffusion de nouvelles variétés [57] [58] [59] [47] [60]. De telles applications ont été réalisées chez plusieurs espèces comme le café [61] ; la carotte [31]; la luzerne [62] [63] [64] [65], *Asparagus officinalis* [66]; le palmier dattier [67] et le palmier à huile [68].

#### 1.4.4 Phases d'apparition d'embryons somatiques

L'embryogénèse somatique est divisée habituellement en deux principales étapes, appelées l'induction et l'expression, dans la première les cellules somatiques acquièrent les caractéristiques embryonnaires par une réorganisation complète de l'état cellulaire, incluant la physiologie, le métabolisme et l'expression des gènes [69]. Il est habituel après un changement dans un ou plusieurs conditions de culture (milieu de culture, composition en hormones de croissance, source de carbone, potentiel osmotique, ect) que les tissus ou les cellules induites atteignent l'étape d'expression, dans laquelle les cellules expriment leur capacité embryogénique et différencient en embryons somatiques [70].

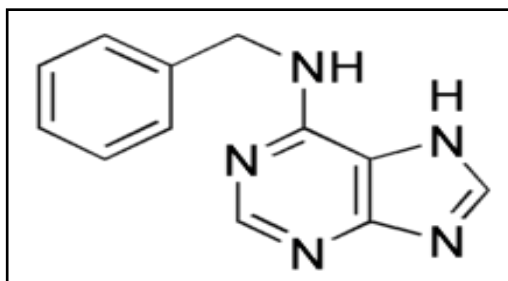
#### 1.4.5 Régulateurs de croissance

Une phytohormone est une substance organique végétale qui régule la croissance et le développement [71]. Ces régulateurs de croissance appartiennent à cinq grands groupes :

##### 1.4.5.1 Les cytokinines (CKs) :

Elles sont utilisées pour stimuler la prolifération des tissus en culture. A une forte concentration, elles déclenchent la néoformation de bourgeons sur cals et favorisent la prolifération des méristèmes axillaires en culture d'apex [26].

Les plus utilisées sont : La zéatine (ZEA), la 2-isopentényladénine (2 ip), benzylaminopurine ou la 6-benzyladénine (BAP ou BA), la kinétine ou la 6-furfurylaminopurine (KIN, KN).

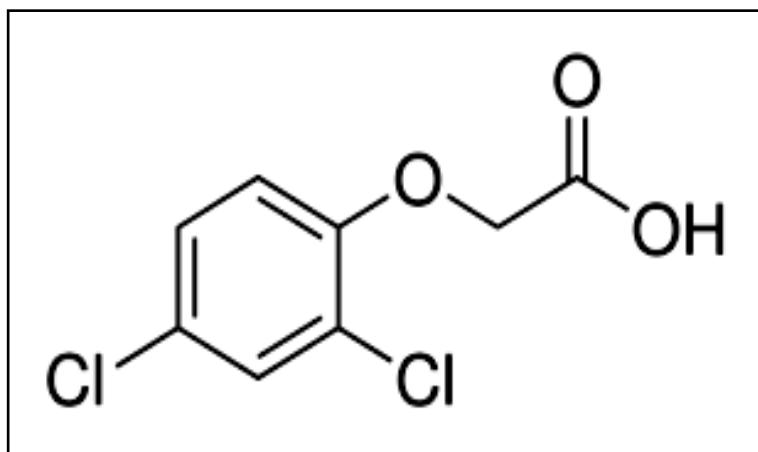


**Figure n°1.10** : Représentation schématique de la molécule de BAP

#### 1.4.5.2 Les auxines

Elles sont impliquées dans les phénomènes physiologiques : le tropisme, la dominance apicale, la division et la différenciation cellulaire, l'abscission, le développement du péricarpe des fruits charnus et la différenciation d'organes [72].

Les plus fréquemment utilisées sont : L'acide  $\beta$ -indolyacétique (AIA), l'acide  $\beta$ -indolybutyrique (AIB), l'acide  $\alpha$ -naphtylacétique (ANA) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) [30].



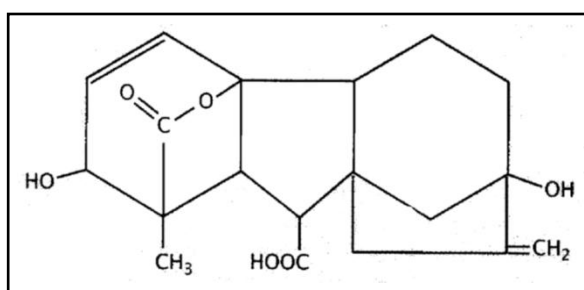
**Figure n°1.11** : Représentation schématique de la molécule de 2.4 D

### 1.4.5.3 Les gibbérellines (GAs) :

Les premières observations (1926) ont été faites sur des plants de riz attaqués par un champignon (*Gibberella*) ; les tiges avaient des entre-nœuds beaucoup plus allongés et les feuilles étaient chlorotiques [27]. Des extraits aqueux du champignon provoquaient les mêmes symptômes d'où l'idée de l'existence d'une substance responsable de ces effets.

La première gibbérelline identifiée est l'acide gibbérellique GA3, c'est un produit naturel, qui se dégrade rapidement en solution aqueuse.

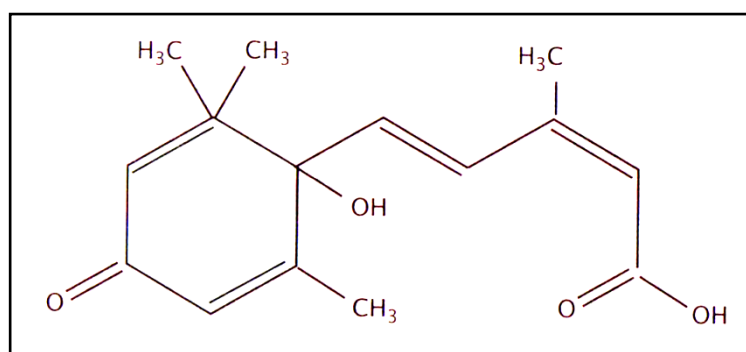
Les gibbérellines favorisent entre autre l'allongement des entre-nœuds de tige.



**Figure n°1.12 :** Représentation schématique de la molécule d'acide gibbérellique

### 1.4.5.4 L'acide abscissique (ABA) :

C'est un inhibiteur naturel très répandu dans les plantes, il favorise l'abscission des feuilles et des fruits et exerce une inhibition de la croissance [73]. Il a aussi une action sur la perméabilité cellulaire aux ions potassium ; par cette action il provoque la fermeture des stomates [27].



**Figure n°1.13 :** Représentation schématique de la molécule de l'acide abscissique

#### 1.4.6 L'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et de stigmate

L'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et de stigmate *in vitro* est une technique de multiplication et d'assainissement récente, très efficace dans l'éradication des pathogènes de la plupart des espèces d'agrumes infectées à l'exception des clémentines [74]. Elle permet de régénérer un nombre important de plants sains à partir de différentes lignées embryonnaires sans l'induction de variation somaclonale [75].

D'ONGHIA *et al.* [10] ont rapporté que par l'utilisation de cette technique, plusieurs maladies de dégénérescence affectant les agrumes ont été éradiquées à 100 % telles que la psorose écailleuse, la panachure infectieuse, l'exocortis, la cachexie, la concavité gommeuse l'impetratura et le cristacortis.

Le pourcentage des explants embryogéniques diffère selon les génotypes et varie entre 0 % et 58 %, une bonne aptitude à l'embryogenèse somatique a été observée chez *C. limon*, *C. sinensis* et *C. reticulata*. Cependant, d'autres espèces comme le *Citrus paradisi* «pamplemoussier» et le *Fortunella margarita* «Kumquat» ont montré un potentiel embryogénique faible par rapport à d'autres espèces telles que les «clémentines» *C. othaitensis* et le «pomelo» *C. maxima*. Ces dernières se sont montrées récalcitrantes à ce processus morphogénétique. [76].

La formation de cellules embryogènes ou d'embryons somatiques dépend du choix de l'explant. L'embryogenèse survient plus rapidement dans les cals provenant d'explants juvéniles, tandis que le potentiel embryogénique des explants de fleurs «Style et stigmate» ou de fruits «d'ovules non développés» ne contenant pas de cellules juvéniles diminue considérablement [76].

L'un des facteurs limitant de l'embryogenèse somatique, particulièrement à partir de différents tissus floraux, est l'explant mis en culture. Les fleurs comme source d'explants doivent être fraîchement collectées avant leur ouverture et conservées à 4°C pour une période maximale de 20 jours avant leur utilisation [77].

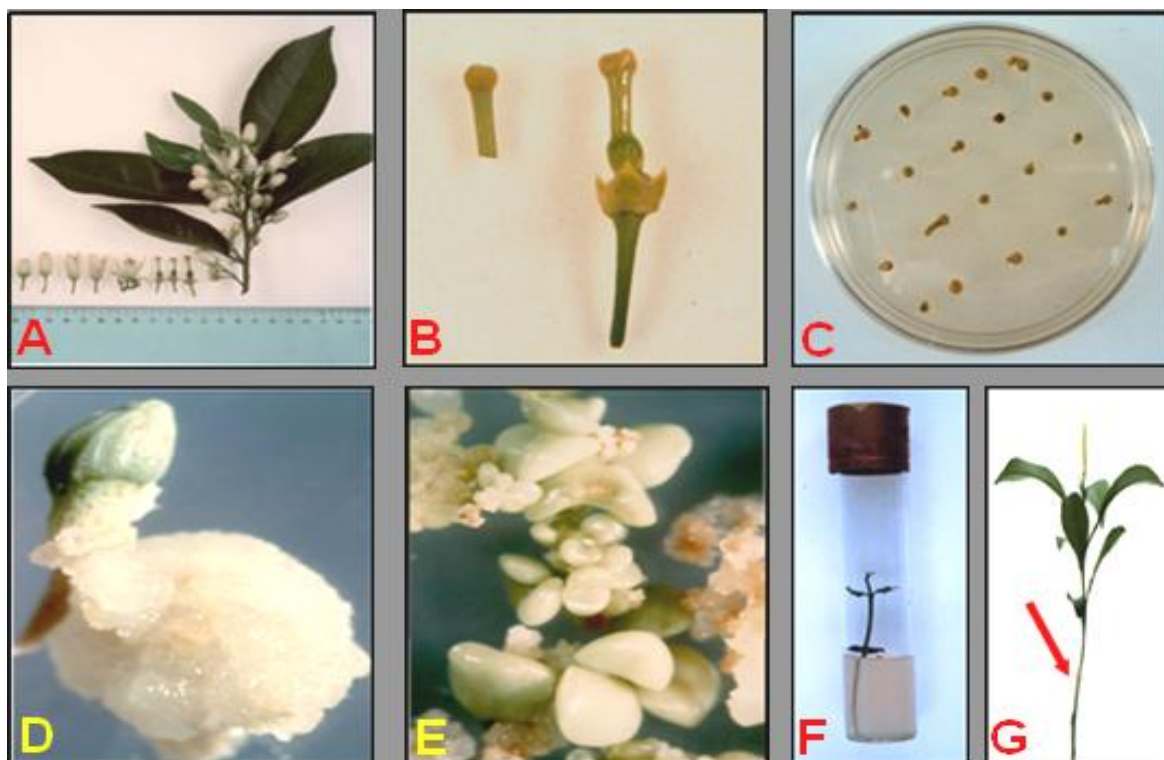
La fidélité génétique des plants régénérés est souvent limitée en raison de leur réversion morphologique à l'état juvénile. D'ONGHIA *et al.*, [10] ont rapporté que les plants d'agrumes régénérés par la culture de style et stigmate *in vitro* expriment plusieurs caractères des plants issus de semis. Les plants régénérés

perdent leurs caractères juvéniles soit après une année de culture en conditions de serre soit après greffage sur un porte-greffe ou d'un écusson de bourgeon sans épines.

Dans ces conditions, la fructification est initiée après 3 années de la culture initiale. Ainsi, les fruits produits par les plants régénérés *in vitro* produisent des fruits identiques à ceux produits par les plants mères. [10]

#### 1.4.7 Les principales étapes de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et de stigmate :

Le protocole de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate *in vitro* (Figure n°1.14) a été mis au point par CARIMI *et al.* [78].



**Figure n°1.14 :** Etapes de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et de stigmate en *in vitro*.

**A)** fleurs fermées ; **B)** pistil séparé de l'ovaire ; **C)** mise en culture de style/stigmate ; **D)** formation de cal ; **E)** Formation d'embryons somatiques ; **F)** Germination d'embryon somatique ; **G)** mini-greffage *in vivo* des plantules régénérées pour acclimatation [74].

#### 1.4.8 Les principaux facteurs influençant l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est un processus morphogénétique dont la réussite dépend de certains facteurs limitants tels que les conditions de cultures, l'état et la nature de l'explant ainsi que la composition du milieu de culture [74].

Etant donné la variabilité des génotypes à régénérer des embryons et les actions qu'exercent les régulateurs de croissance sur cette régénération, une meilleure compréhension des facteurs génétiques et physiologiques qui contrôlent ces mécanismes aiderait à mieux les maîtriser [79].

Effectivement, TAN et QIAN [80], ont rapporté que les conditions environnementales des cultures (température, lumière, atmosphère, etc.) peuvent influencer fortement la prolifération cellulaire au cours de la callogénèse ainsi que l'embryogenèse somatique chez diverses plantes :

##### 1.4.8.1. Le milieu de culture

Chez les agrumes, le milieu de culture utilisé est généralement à base de milieu MS (MURASHING et SKOOG) [81]. Le saccharose et l'extrait de malt sont fréquemment utilisés comme source de carbone.

Effectivement, CARIMI [76], confirme que les fortes concentrations de saccharose chez les agrumes permettent d'augmenter les chances de formation d'embryons somatiques.

L'addition des vitamines et des hormones de croissance telle que la BAP (6-benzylaminopurine) favorise la croissance de cellules et leur différenciation [80]. L'ordre de  $13.3 \mu\text{M}$  permet la stimulation de l'embryogenèse somatique des styles et stigmates.

##### 1.4.8.2. La nature et l'état de l'explant

L'un des facteurs limitant de l'embryogenèse somatique, particulièrement à partir de différents tissus de fleurs est l'explant mis en culture.

Les fleurs comme source d'explants doivent être fraîchement collectées avant leur ouverture et conservées à 4 °C pour une période maximale de 5-6 jours [74].

Plusieurs paramètres sont à prendre en considération dans le choix des explants :

- Les fleurs sources d'explant ne contenant pas de cellules juvéniles, leur potentiel embryogénique diminue considérablement [76].
- La callogénèse dépend de la qualité et la nature de l'explant.
- Chez les agrumes polyembryonies, les explants issus de tissus floraux sont les plus favorables à l'embryogenèse somatique [76]. Chez les agrumes monoembryonnés, les embryons somatiques sont obtenus à partir des fragments végétatifs [83].

#### 1.4.8.3. Les régulateurs de croissance

Les nombreux travaux publiés montrent que l'auxine est un facteur important pour déclencher le processus conduisant à la formation d'embryons somatiques. Au cours de la première phase de culture, l'auxine souvent utilisée est l'acide 2-4dichlorophenoxyacétique (2-4D). D'autres auxines telles l'ANA, l'AIA ou le picloram peuvent être employées. Pendant cette période, les cellules se divisent et dans le cas d'évolution favorable, on observe des amas globulaires ou amas proembryogènes. Après cette phase d'induction embryonnaire, le transfert des cultures sur un milieu sans auxine permettra le développement des embryons [84].

Les gibbérellines sont rarement utilisées dans les milieux de cultures initiaux ; dans certains cas ces hormones lèvent la dormance de certains embryons somatiques. Une cytokinine (BAP ou K) est nécessaire au développement des embryons jusqu'au stade cotylédonaire [79].

### 1.5 Importants problèmes phytosanitaires des Agrumes

Les agrumes sont attaqués par une trentaine de maladies de dégénérescence causées par des viroïdes, virus et mycoplasmes ou d'autres organismes procaryotes endocellulaires. La plupart de ces organismes prolifèrent dans les tissus vasculaires qui véhiculent la sève et les troubles qu'ils occasionnent ont un caractère infectieux. Ils sont transmissibles de plante à plante



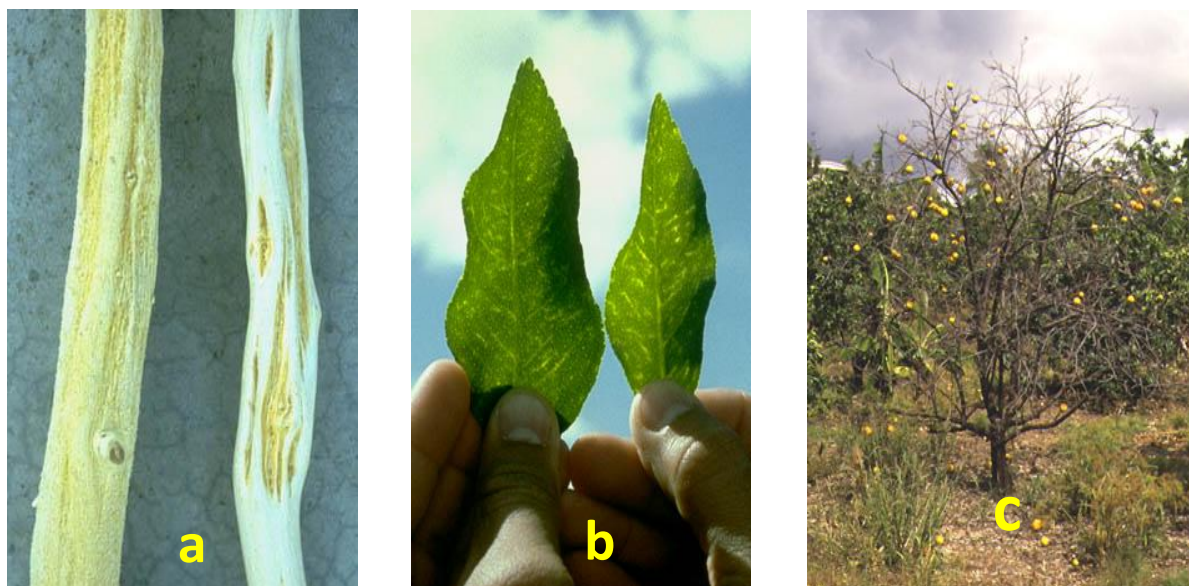
soit directement par la greffe lors de la soudure des greffons, soit indirectement par des insectes vecteurs. Dans le cas des viroïdes, l'infection se propage par simple contact avec des outils contaminés [85].

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

### 1.5.1 La Tristeza «*Citrus tristeza Virus* : CTV»

La tristeza des agrumes causée par *Citrus tristeza virus* (CTV) constitue l'un des problèmes majeur qui limitent la production des citrus à travers le monde. Le virus de la tristeza a détruit à lui seul approximativement 50 millions d'arbres pendant une durée de 40 à 50 ans [86]. Elle peut être transmise par plusieurs types de pucerons et affecte presque exclusivement tous les agrumes ayant comme porte-greffe le bigaradier [11]. Ce dernier est de mois en mois recommandé voire déconseillé au profit des citranges.

Les symptômes connus de cette virose se manifestent sur le tronc par des cannelures et des striures et sur feuillage par un jaunissement et la chute des feuilles. Au stade final, l'arbre dépérit et meurt [87].



**Figure n°1.15:** Différents symptômes provoqués par *Citrus tristeza Virus*  
**a :** Cannelures sur tronc; **b :** Jaunissement des feuilles; **c :** Dépérissement de l'arbre

### 1.5.2 Psorose écailleuse «*Citrus psorosis Virus* : CPsV»

Deux types de psoroses, la première est la psorose A, psorose véritable ou psorose classique elle est caractérisée par des lésions au niveau du tronc et des branches ainsi qu'une coloration rougeâtre interne du bois (Figure n°1.15a)., aussi par des symptômes de mouchetures foliaires lorsque l'on greffe sur les agrumes indicateurs adéquats et par le fait qu'elle ne se transmet pas de manière mécanique (pour la majorité des isolats) [88]. La seconde, la psorosis B, aussi appelée « citrus ring spot », est associée à des particules virales spécifiques et se transmet mécaniquement et peut donc être identifiée par les réactions des plantes herbacées indicatrices ; elle se manifeste par la formation des écailllements d'écorce (Figure n°1.15b).

Les types de psoroses connues en Algérie sont la psorose écailleuse, la psorose alvéolaire et la psoroses infectieuse. Les symptômes de ces psoroses se manifestent sur feuilles par des mosaïques, des chloroses et des gaufrages [87].



**Figure n°1.16** : Symptômes de psorose sur arbre infecté

**a** : Coloration rougeâtre interne du bois; **b** : Ecaillage de l'écorce

### 1.5.3 Stubborn des agrumes «*Spiroplasma citri*»

La maladie des fruits en gland ou Stubborn, a été décrite comme une virose par Fawcett, en Californie, en 1946. A l'heure actuelle, elle représente, tant en Californie qu'en Arizona, le problème le plus grave. Dans certains vergers, plus de 50 % des arbres sont atteints et n'ont plus aucune valeur commerciale. Au Maroc, des symptômes semblables à ceux décrits par Fawcett ont été observés à partir de 1949. En Israël, les manifestations décrites sous le nom de « Little leaf disease » sont également dues au Stubborn [89].

Le symptôme le plus typique de la maladie est la déformation du fruit qui rappelle alors la forme d'un gland de chêne. D'autres manifestations telles que la courbure de la columelle du fruit, l'inversion de coloration, le goût désagréable de la chair, la coloration bleuâtre anormale de l'albêdo, sont souvent associés au Stubborn. Les floraisons à contre-saison, le développement des yeux multiples des rameaux, l'aspect broussailleux de l'arbre, la présence anormale de bois mort, la réduction de la taille des feuilles et leur forme en cuillère, un manque de vigueur des pousses, font partie également du faciès « Stubborn » [89]. (Figure n°1.17 a b)

Une autre caractéristique de la maladie est le fait que souvent une seule partie de l'arbre présente des symptômes et que l'apparition de fruits en gland peut ne pas se produire tous les ans sur un même arbre. Sur certains arbres tous les symptômes sont visibles alors que sur d'autres, ils sont incomplets. Toutes les variétés et tous les porte-greffes seraient sensibles.

Actuellement, d'autres moyens de propagation que le greffage sont soupçonnés pour le Stubborn, sans qu'il soit possible de savoir si les insectes vecteurs, la graine ou le pollen jouent un rôle dans sa dissémination [89].



**Figure n°1.17 : Symptômes de stubborn**

**a : Fruits déformé ; b : Petites feuilles en forme de cuillère**

#### 1.5.4 L'exocortis (*Citrus exocortis* Viroid CEVd)

La maladie de l'exocortis a été décrite comme causant des écailllements de l'écorce de *Poncirus trifoliata* et de certains de ses hybrides, notamment les citranges (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), mais aussi le limettier, L'écaillage sur un porte-greffe commence généralement par le bas (Figure n°1.18). La partie interne de l'écorce reste vivante. Des enroulements foliaires et des épines asties foliaires ainsi que des nécroses des veines sont observés chez le cédratier (*C. medica*) [90]. Le développement de l'arbre est entravé ce qui provoque un certain nanisme, les feuilles jaunissent et tombent, les pousses annuelles sont réduites et les productions sont compromises [11].



**Figure n°1.18** : Symptômes d'écailllements de l'écorce par *Citrus exocortis* Viroid (CEVd)

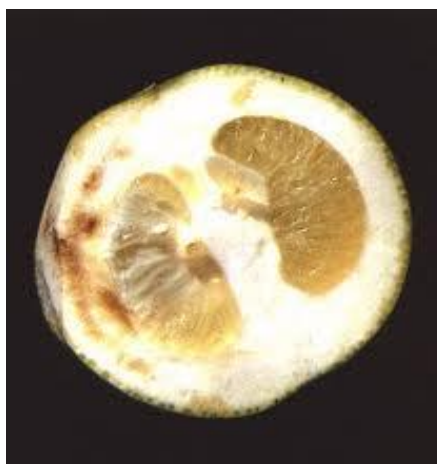
#### 1.5.5 L'impetratura :

L'Impetratura a été décrite en 1955, en Sicile, par RUGGIERI in Praloran [89] qui peu après en établissait la nature virale. La maladie a été observée surtout dans le Bassin Méditerranéen.

L'Impetratura est caractérisée par la présence de poches de gomme dans l'albédo des fruits. Tous les fruits d'un arbre malade ne sont pas forcément atteints. Certains présentent extérieurement des bosses en relief qui sont dures au toucher d'où le nom d'Impetratura (consistance de pierre). Ces bosses ont tendance à conserver leur couleur verte après la véraison (Figure n°1.19).



En pratiquant une coupe au niveau de celles-ci, un dépôt de gomme solide ou plus ou moins liquide apparaît dans l'albédo ainsi que dans la columelle et parfois autour des pépins. La chair elle-même n'est nullement affectée par la maladie. L'Impietratura semble provoquer également une chute de jeunes fruits et certains auteurs lui attribuent une diminution de la production. La présence de fruits malades n'est pas observée tous les ans sur un même arbre [89].



**Figure n°1.19** : Symptômes d'impietratura sur fruits

#### 1.5.6 Le Cristacortis :

La nature virale de cette maladie a été établie en Corse, en 1964, par VOGEL et BOVE. Cette maladie a été observée depuis dans plusieurs pays du Bassin méditerranéen. [89]

Le Cristacortis provoque, sur le tronc ou les branches de nombreuses espèces et variétés, des dépressions plus ou moins profondes, visibles extérieurement. Après enlèvement de l'écorce, il apparaît que ces dépressions sont dues à des excroissances d'écorce qui pénètrent profondément dans le bois. Des imprégnations gommeuses sont trouvées dans le fond des trous du bois. Ce « Stem pitting » avait fait baptiser initialement la maladie : « Stem pitting » du bigaradier et de l'oranger « Tarocco »; ces deux variétés ayant été les deux premières à manifester la maladie [89].

La plupart des espèces et variétés inoculées expérimentalement ont manifesté des symptômes. Il semble cependant pour l'instant que le Tangelo « Orlando », le bigaradier, l'oranger « Tarocco » et le mandarinier « commun » soient les plus sensibles. La propagation par greffage est le seul mode de transmission reconnu jusqu'ici [89].

La maladie de Cristacortis est présente en Algérie, mais le nombre d'arbres infectés dans les vergers est inconnu. Les arbres d'orange « Hamlin » montrent des symptômes très remarquables de cristacortis qui ont été rapportés par SALIBE dans la région de Mitidja [91].



**Figure n°1.20** : Symptôme de cristacortis sur mandarinier greffé sur bigaradier

## CHAPITRE 02 :

### MATERIELS ET METHODES

L'embryogenèse somatique est un processus biologique qui aboutit à l'obtention d'un nombre illimité d'embryons à partir d'une cellule ou d'un groupe de cellules somatiques [92]. C'est une méthode de multiplication végétative qui permet de régénérer à partir d'un seul explant, un grand nombre d'embryons somatiques, lesquels deviendront des plants dont le génotype est identique à la plante mère source [93].

L'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et de stigmate *in vitro* s'avère une excellente technique pour l'élimination des différents pathogènes affectant la plupart des espèces des genres Citrus [10].

L'objectif de ce présent travail est l'application de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate pour la régénération et l'assainissement de nombreux génotypes d'agrumes de la collection nationale, maintenue à l'ITAFV à Boufarik (Blida).

Notre essai est effectué au sein du laboratoire central de l'institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV), à Tessala El-Merdja. Alger.

#### 2.1 Origine du matériel végétal :

Durant la période de pleine floraison (mi mars-mi mai ) et avant l'anthèse, les boutons floraux (Figure n° 2.1) de 08 variétés appartenant aux trois espèces d'agrumes des genres *Citrus* (*Citrus sinensis* , *C. limon* et *C. reticulata* ) ont été collectés à partir des vergers de la collection nationale des agrumes, relevant de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV), localisés à Halouiya, Commune de Soumaa, Boufarik. Blida (Figure n° 2.1 et Tableau n° 2.1).



**Figure n° 2.1** : Boutons floraux des différentes espèces d'agrumes étudiées

**a** : *C. limon* (Beni Abbes) ;

**b** : *C. reticulata* (Mandarine de Blida.) ;

**c** : *C. sinensis* (oranger Miliar).

**Tableau 2.1** : Différentes variétés d'agrumes testées durant l'expérimentation

<b>Espèces</b>	<b>Variétés</b>
<i>Citrus sinensis</i> (Orange)	Shamouti station (OSS), Meski (OMS), Bey (OB), Miliar (OML),
<i>Citrus limon</i> (Citron)	Beni Abbes (CBA), Afrique du nord (CAN), Dellys (CD)
<i>Citrus reticulata</i> (Mandarine)	Mandarine de Blida (MB)



## 2.2 Technique de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate :

### 2.2.1 Préparation du milieu de culture :

Pour l'induction de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate, le milieu de culture utilisé dans notre étude a été décrit par CARIMI et *al*, [78] et dont la composition est comme suit :

Milieu MS (4.3 g/l) décrits par MURASHIGE et SKOOG [34] enrichi par des vitamines (1ml/L), saccharose (50g/L) source de carbone, (0.5 g/L) d'extrait de malt composant ayant un effet positif sur le développement des agrumes *in vitro*, (7g/L) d'Agar pour solidifier le milieu, sans ou avec une hormone de croissance ( BAP ou 2.4D selon le traitement étudié).

**Tableau n° 2.2 :** Composition des milieux de culture en macroéléments, microéléments et vitamines du milieu de base MURASHIGE et SKOOG (1962).

Constituants	Solution mère (mg par litre)	Volume à ajouter (ml par litre)	Concentration finale (mg par litre)
<b>Macroéléments 20X</b>		<b>50 ml</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33000		1650
<b>KNO<sub>3</sub></b>	38000		1900
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	8800		440
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	7400		370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3400		170
<b>Microéléments 200X</b>		<b>5 ml</b>	
KI	166		0,83
H <sub>3</sub> B <sub>0</sub> <sub>4</sub>	1240		6,2
MnSO <sub>4</sub> -4H <sub>2</sub> O	4460		22,3
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1720		8,6
NaMoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	50		0,25
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	5		0,025
CaCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	5		0,025
<b>Fer1000X</b>		<b>1 ml</b>	
Na <sub>2</sub> , EDTA	37300		33,3
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	25800		27,8

<b>Vitamines 1000X</b>		<b>1 ml</b>	
Thiamine HC1	100		0,1
Acide nicotinique	700		0,5
Pyridoxine HC1	500		0,5
Glycine	2000		2
Myo-inositol			100
<b>Sucre</b>			
saccharose			50000
<b>Agar</b>			7000

Le pH du milieu est ajusté à  $5.7 \pm 0.1$  avant la stérilisation par autoclavage à une température de  $120^{\circ} \text{C}$  pendant 20 min et sous une pression de 2 bars. Par la suite, le milieu est écoulé dans des boîtes de Pétri (90 mm  $\varnothing$ ) à raison de 20ml/boite, ensuite scellé par du Parafilm M et conservé au laboratoire à la température ambiante.

### 2.2.2 Préparation de l'explant

- Stérilisation des fleurs

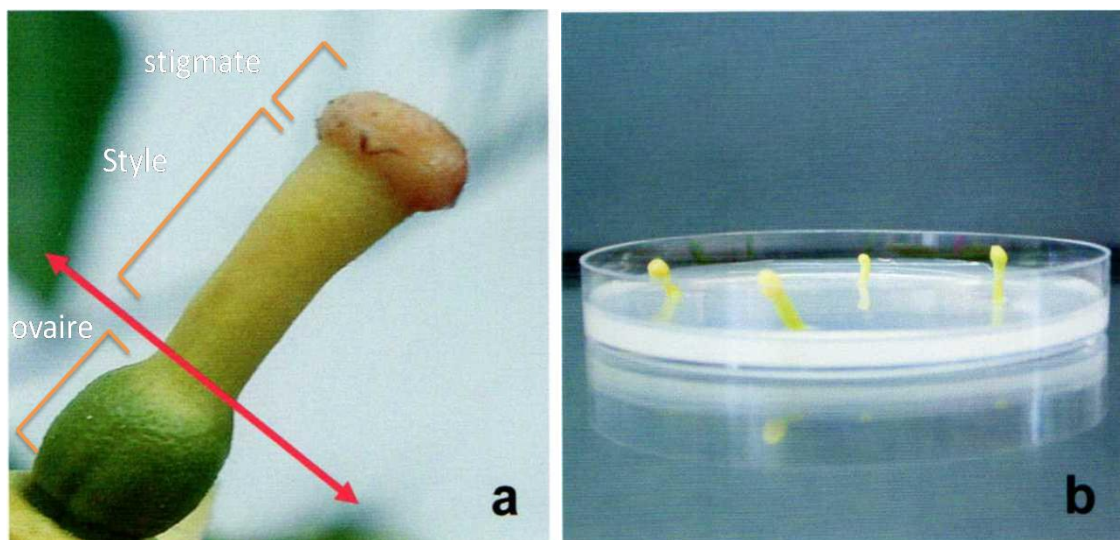
Les fleurs utilisées pour l'embryogenèse somatique ont été collectées avant leur ouverture afin d'éviter l'introduction des solutions stérilisantes à l'intérieur durant l'étape de la stérilisation. Une partie des fleurs a été utilisée directement par la culture de stigmate et style, l'autre partie a été conservée à  $4^{\circ} \text{C}$  dans des boîtes de Pétri stériles scellées par du Parafilm M pour une période de 2 à 3 jours en attendant leur utilisations.

Sous une hotte à flux laminaire, les fleurs sont stérilisées par immersion durant 5mn dans une solution d'éthanol (70% v/v d'eau). Après trois rinçages (3mn) avec de l'eau distillée stérile, les fleurs sont traitées pendant 20 mn avec une solution d'hypochlorite de sodium (20% v/v d'eau) on agitant de temps en temps et rincées par la suite pendant 5 fois avec de l'eau distillée stérile. En fin de stérilisation, les fleurs sont étalées pour séchage sur un papier buvard stérile

### 2.2.3 La mise en culture de style et de stigmate

Dans des conditions aseptiques, stigmate et style sont mises en culture *in vitro* (Figure 2.2) selon le procédé suivant :

- Les fleurs sont ouvertes à l'aide d'une pince et scalpel stériles.
- Stigmate et style sont séparés de l'ovaire par une coupe longitudinale à l'axe perpendiculaire (Figure 2.2 a).
- Le stigmate et style sont placés verticalement dans des boîtes de Pétri, la surface de la coupe en contact avec le milieu de culture .10 explants sont placés dans chaque boîte (Figure 2.2 b).
- Les cultures sont placées dans une chambre de culture à une température de  $25 \pm 1^{\circ} \text{C}$  avec une photopériode de 16 heures.



**Figure n° 2.2** : Opération de coupe et mise en culture du style et stigmate

**a** : Coupe séparant stigmate et style du l'ovaire ; **b** : La mise en culture des explants (stigmate et style)

### 2.2.4 Incubation et subculture

Les boîtes ensemencées sont mises dans une chambre de culture dans les conditions suivantes :

- Température :  $25 \pm 1^\circ\text{C}$
- Photopériode : 16 h jour.
- Intensité lumineuse :  $50\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Périodiquement, après 4-6 semaines de la culture initiale, des subcultures de cals sont effectuées dans le même milieu à l'exception en cas d'obtention des embryons, où ces derniers seront transférés dans un milieu de culture sans l'hormone [76].

### 2.2.5 Régénération de plantules

Après germination des embryons somatiques (Figure n° 2.3), ces derniers sont transférés dans des tubes à essai (155×33 mm) contenant 20 ml de milieu sans hormone à raison d'un embryon/tube (Figure n° 2.4), Les tubes avec plantules régénérées sont transférés pour incubation dans une chambre de culture :

- une température de 25 à 27°C.
- une photopériode de 16 heures jour pour une période de 2 à 3 mois
- Intensité lumineuse :  $100\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figure 2.3) [76].



**Figure n° 2.3 :** germination des embryons somatiques



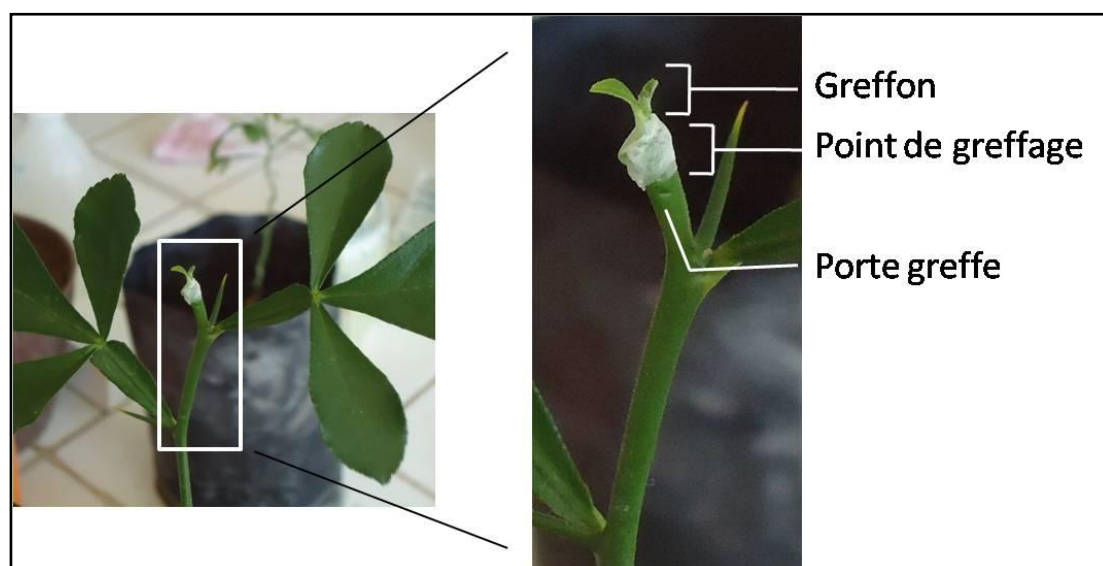
**Figure n° 2.4 :** plantules régénérées en tube à essai

### 2.2.6 Greffage des plantules :

Après 2 mois d'incubation dans des tubes à essai, les plantules régénérées atteignent 2-3 cm de long, elles sont retirées des tubes à essai et greffées sur des portes greffes de *Citrange Troyer* âgés de 3 à 4 mois

Après greffage, les plantules sont recouvertes par des sacs en polyéthylène pour le maintien de l'humidité et favoriser la réussite du greffage, par la soudure du greffon au porte-greffe.

Les plantules ainsi greffées sont transférées sous serre vitrée à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  pour acclimatation. Un mois après la réussite du greffage, les sacs en polyéthylène sont retirés pour permettre aux plantes de continuer leur développement (Figure n°2.5).



**Figure n°2.5** : Mini-greffage *in vivo* des plantules régénérées pour acclimatation

### 2.2.7 Acclimatation des plants greffés :

Après greffage, les plantules sont recouvertes par des sacs en polyéthylène pour le maintien de l'humidité et transférées par la suite dans une serre ou chambre de culture pour acclimatation (Figure 2.6) [94].



**Figure n°2.6 :** Plantules d'agrumes régénérées en phase d'acclimatation

### 2.2.8 Les facteurs étudiés :

1<sup>er</sup> Facteur : variétés (huit variantes): huit (8) variétés

- Oranger : Shamouti station, Meski, Bey, Miliarh.
- Citronnier : Beni abbes, Afrique du nord, Dellys.
- Mandarinier : Mandarine de Blida.

2<sup>ème</sup> Facteur : substances de croissance (hormone) : Quatre (4) variantes

- I : un Témoin (sans hormone)
- II : BAP (3 mg/l)
- II' : 2.4 D (2 mg/l)
- III : 2.4D + BAP (2 mg/l + 1.5 mg/l respectivement)

#### ❖ Unité expérimentale :

La boîte de Pétri (90 mm de Ø), contient 20 ml de milieu de culture, avec ou sans hormone.

❖ Dispositif expérimental :

- ✓ 10 explant par boîte de Pétri
- ✓ 3 boîtes par variété (3 répétitions)

**Tableau n° 2.3 :** Dispositif expérimental des différents traitements

		<b>1<sup>er</sup> facteur : <i>Hormone</i></b>			
		<b>I (Témoin)</b>	<b>II (2.4 D)</b>	<b>II' (BAP)</b>	<b>III (2.4 D + BAP)</b>
		<b>(0 mg/l)</b>	<b>(2 mg/l)</b>	<b>(3mg/l)</b>	<b>(2 mg/l + 1.5 mg/l)</b>
<b>2<sup>ème</sup> facteur : variété</b>	<b>C. Beni Abbes (CBA)</b>	CBA x TM	CBA x 2.4 D	CBA x BAP	CBA x (2.4 D + BAP)
	<b>C. Afrique du nord (CAN)</b>	CAN x TM	CAN x 2.4 D	CAN x BAP	CAN x (2.4 D + BAP)
	<b>C. Dellys (CD)</b>	CD x TM	CD x 2.4 D	CD x BAP	CD x (2.4 D + BAP)
	<b>M. de Blida (MB)</b>	MB x TM	MB x 2.4 D	MB x BAP	MB x (2.4 D + BAP)
	<b>O. Shamouti Station (OSS)</b>	OSS x TM	OSS x 2.4 D	OSS x BAP	OSS x (2.4 D + BAP)
	<b>O. Meski (OM)</b>	OM x TM	OM x 2.4 D	OM x BAP	OM x (2.4 D + BAP)
	<b>O. Bey (OB)</b>	OB x TM	OB x 2.4 D	OB x BAP	OB x (2.4 D + BAP)
	<b>O. Miliah (OML)</b>	OML x TM	OML x 2.4 D	OML x BAP	OML x (2.4 D + BAP)

### 2.2.9 Evaluation des résultats :

Les explants (stigmate/style) des 3 espèces d'agrumes avec les différents génotypes ont été suivis régulièrement afin d'évaluer la période d'induction de la callogénèse et la formation des premiers embryons somatiques.

#### 2.2.9.1 . Cas de la callogénèse :

L'évaluation de la callogénèse a été appréciée quantitativement (la durée de la phase callogénèse, nombre d'explants callés) et qualitativement (importance des cals).

La callogénèse est exprimée par le pourcentage d'explants callogènes pendant la durée d'exposition sur le milieu d'induction qui diffèrent selon le type d'hormone de croissance et le génotype.

#### 2.2.9.2. Cas de l'embryogénèse

La phase d'embryogénèse est évaluée aussi quantitativement (la durée de la phase embryogénèse, nombre de cals embryonnés...), Aussi le rapport entre le nombre moyen d'embryons secondaire apparus sur les embryons primaires.

### 2.2.10 Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus sont traités, l'ANOVA à 2 critères de classification a été appliquée pour la recherche d'effet significatif, par une analyse de la variance au seuil de signification  $\alpha = 5\%$ . Le test de NEWMAN et KEULS permet de constituer les groupes de traitements homogènes.



## CHAPITRE 03 :

### RESULTATS ET DISCUSSION

La mise en culture des tissus végétaux est l'une des étapes les plus difficiles dans les techniques de culture *in vitro* particulièrement chez les espèces ligneuses pérennes, notamment les agrumes [95].

Lors de notre étude, un très grand nombre de fleurs de a été collecté parce que plusieurs d'entre elles ont été écartées lors des premières manipulations (l'étape de la stérilisation et la mise en culture du style et stigmate) pour les raisons suivantes :

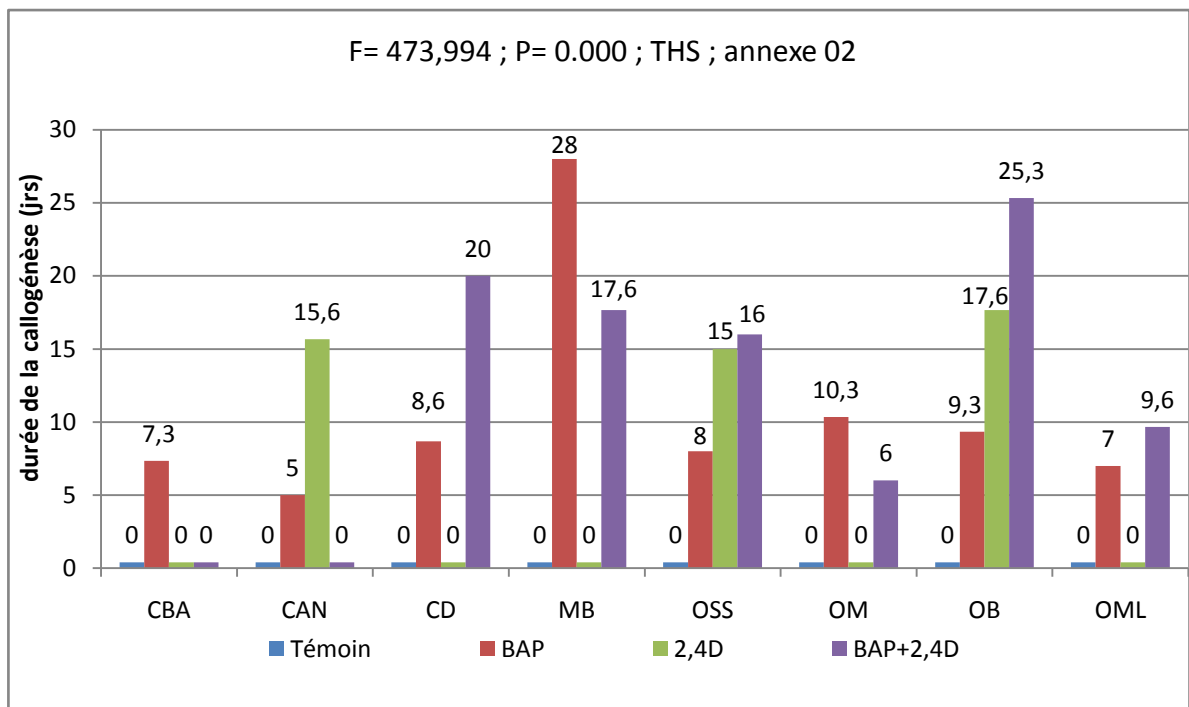
- Leur ouverture durant la période de stockage à 4 °C, ce qui induit l'endommagement des explants par les solutions stérilisantes.
- Absence de pistil, phénomène très fréquent chez *C.limon*.
- Présence d'un brunissement à l'intérieur des fleurs particulièrement au niveau du stigmate.

Après la mise en culture des explants dans les milieux appropriés, nous nous sommes intéressés aux paramètres suivants:

1. Durée de déclenchement de la callogénèse des explants.
2. Pourcentage des explants callés.
3. Durée de la callogénèse
4. Importance des cals.
5. Caractéristiques des cals selon les traitements hormonaux.
6. Pourcentage des embryons primaires par variété.
7. Durée de déclenchement de l'embryogénèse.
8. Nombre d'embryons primaires par Variété.
9. Nombre d'embryons secondaires par Variété.
10. Nombre d'embryons secondaires par embryons primaires.

### 3.1 Durée de déclenchement de la callogénèse des explants :

Pour le premier paramètre qui concerne la durée de déclenchement de la callogénèse, les résultats montrent des différences significatives entre les variants de chaque facteur à part, et aussi l'effet de l'interaction des deux facteurs ( $P=0.000$ , Annexe 01) (Figure n° 3.1).



**Figure n°3.1 :** Durée de déclenchement de la callogénèse des explants.

De nombreux auteurs ont rapporté que la réussite du processus de la callogénèse est liée au type de phytohormones utilisées dans le milieu de culture.

Les petites durées de déclenchement de la callogénèse sont enregistrées pour le traitement hormonal BAP et cela avec toutes les variétés avec des différences de 3 à 5 jours. Le développement des cals est observé sur la base de style 4 semaines après le traitement initial [78]. La callogénèse commence après 4 à 9 jours de la mise en culture des explants [96].

RAHAMAN *et al.* [97] ont mis en évidence le rôle de la BAP et de la kinétine sur l'induction de cals pour plusieurs espèces du genre *Citrus*.

L'effet positif de l'hormone de croissance BAP (6-benzylaminopurine) sur l'induction de la callogénèse chez différents cultivars de *C.limon* régénérés par l'embryogénèse somatique à partir de la culture de style et stigmate [94].

Plusieurs compositions du milieu de culture sont utilisées et la combinaison de deux hormones ANA et 2.4D avec l'acide gibbérellique ont donné des succès.

Les facteurs comme l'intensité lumineuse, la concentration des éléments de base, saccharose, niveau d'azote et la composition en éléments minéraux, l'agar, hormones de croissance et le pH affectent l'induction [98], Lors de notre investigation, la callogénèse a été observée après une période relativement longue à savoir 28 jours chez le mandarinier de Blida avec l'hormone de croissance (BAP).le même constat avec l'oranger de Bey (OB) où l'expression de la callogénèse fut observée après ( 25 jours).avec la combinaison hormonale BAP + 2.4D

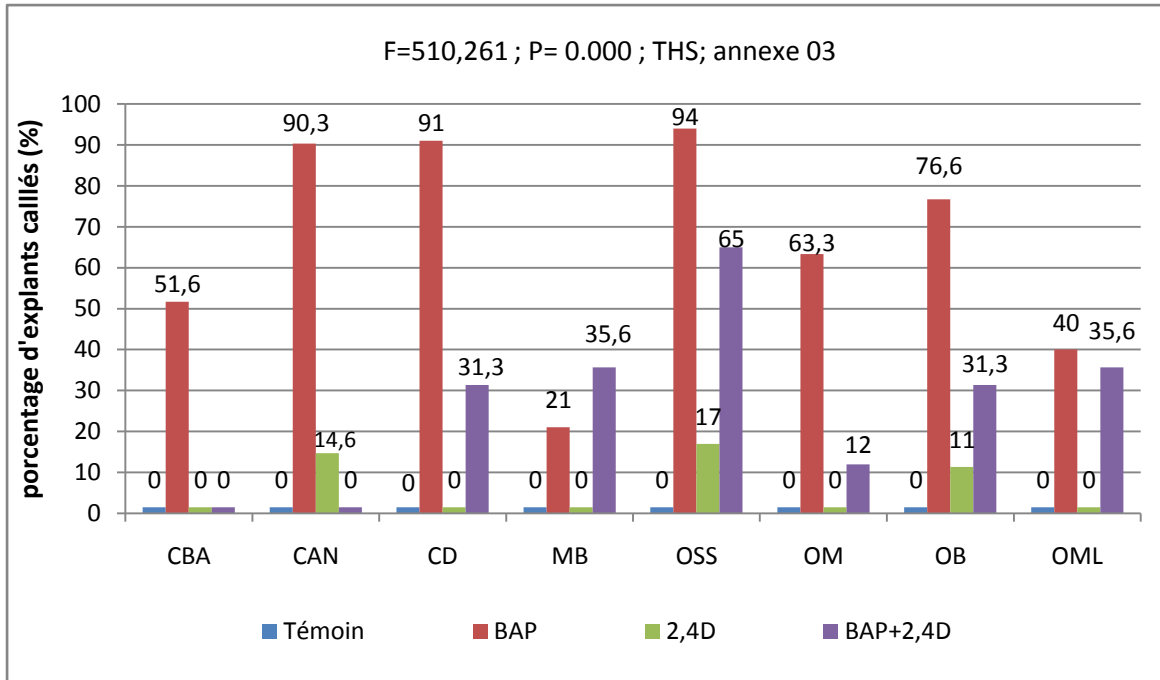
Aucune callogénèse ne fut observée avec le traitement témoin, sans hormone de croissance. Les prétraitements, la composition du milieu de culture et l'environnement de la culture influence l'efficacité d'induction des cals et la production des embryons [99].

L'aptitude à la callogénèse peut varier, selon la partie de la plante mise en culture [30].

### 3.2 Pourcentage des explants callés :

Le pourcentage de callogénèse diffère d'une variété à une autre et selon les différents types d'hormone.

L'analyse de la variance montre un effet significatif de chaque facteur à part, et aussi l'effet d'interaction des deux facteurs ensemble est très hautement significatif ( $P=0.000$ ) (Annexe 02) (Figure n° 3.2)



**Figure n°3.2 : Pourcentage des explants callés**

Pour le facteur hormone de croissance, on constate que le traitement hormonal BAP provoque la callogénèse chez toutes les variétés avec des pourcentages plus élevés des variétés C. Afrique du Nord (CAN), C. Dellys (CD) et O. Shamouti Station (OSS), avec des pourcentages de plus de 90%. ceci confirme les résultats obtenus par CARIMI et al. [100] et NANDA et ROUT [101] qui rapportent que dans certains systèmes de multiplication *in vitro*, les cytokinines utilisés seuls étaient suffisants pour l'induction de l'embryogénèse somatique. Et RAEMAKERS et al. [102] mentionnent que le BAP est le plus fréquemment utilisé (57%).

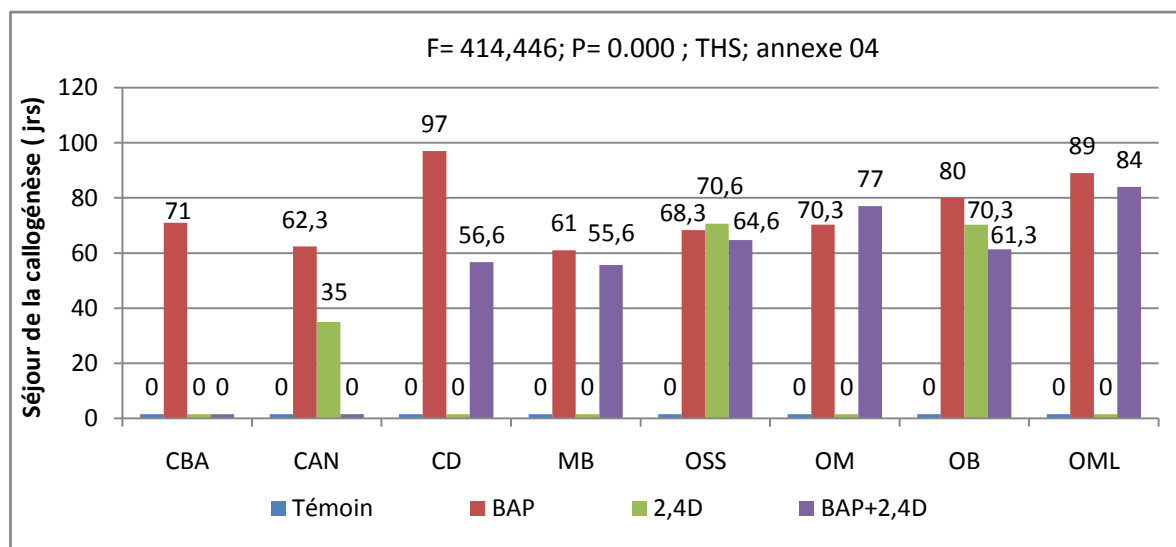
En seconde niveau, on trouve des valeurs moyennes avec la combinaison hormonale BAP+ 2.4D pour 6 variétés à part C. Beni Abbes (CBA) et C. Afrique du Nord (CAN). SMIRNOV et SMIRNOVA [101] mentionnent que des chercheurs ont noté que la capacité de formation des cals est exprimée sur un milieu spécifique pour chaque taxon et qu'elle est aussi déterminée génétiquement .

Le traitement sans hormone de croissance n'a rien développé comme explant callé avec toutes les variétés, contrairement à l'hormone 2.4D qui a donné les faibles pourcentages (15 % au moyenne) avec seulement 3 variétés (C. Afrique du

Nord (CAN), O. Shamouti Station (OSS) et O. Bey (OB). CHAKRAVARTY et GOSWAMY [104] mentionnent que pour trois porte-greffes testés, la présence du 2,4-D seul a été suffisante pour l'induction de cals, et ont également souligné l'importance de ce phytorégulateur pour la callogénèse des *Citrus*.

### 3.3 Durée de la callogénèse

Pour le paramètre qui est la durée de vie des cals formés, les résultats obtenus montrent des différences significatives entre les variants de chaque paramètre à part, et aussi une différence très hautement significative ( $P=0.000$ ) concernant l'effet d'interaction entre les deux facteurs, et cela d'après le tableau de l'analyse de la variance (Annexe 03).



**Figure n°3.3 :** Durée de la callogénèse

On constate d'après la figure que la durée de la callogénèse est meilleure pour le traitement BAP du premier facteur hormone de croissance qui a donné des bons résultats avec toutes les variétés surtout la variété C. Delys (CD) avec 97 jours. En effet, BOUSSAIDI [105], rapporte que le transfert régulier des cals permet une meilleure alimentation du cal en éléments nutritifs et en régulateurs de croissance.

En deuxième classe, le traitement BAP+ 2.4D donne des durées moyennes de  $65 \pm 5$  jours. (Figure n°3.3). Selon ANANTHAKRISHNAN et al. [106], dans le cas de l'acajou, l'ABA en présence de 2.4 D induit une prolifération des cals sur la surface des embryons, il est conclu que le 2.4D est préconisé pour l'induction des embryons, tandis que sa présence continuée dans le milieu de subculture ne va

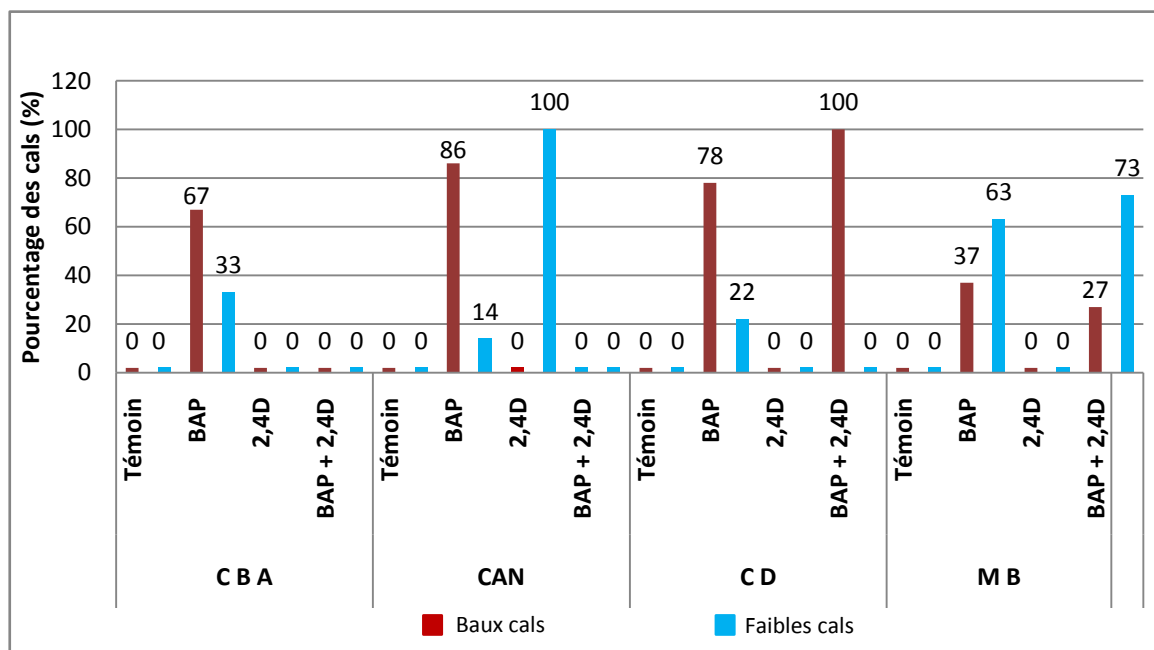
pas améliorer un développement ultérieur après le stade torpille. Le même effet est obtenu lorsque le 2.4D est absent dans le milieu de culture.

Le résultat du traitement hormonal 2.4D seul a donné aussi des durées de séjour moyennes mais seulement avec 3 variétés à savoir C.Afrique du Nord (CAN), O. Shamouti Station (OSS) et O. Bey (OB). Contrairement au témoin qui n'a pas donné auparavant des cals, et d'après certains travaux de REINERT et BAJAJ [107], où ils suggèrent que l'embryogenèse pourrait cesser au cours des repiquages successifs sur des milieux dépourvus de 2.4D par suite de l'épuisement d'un facteur embryogène.

### 3.4 Importance des cals :

#### 3.4.1- Groupe des citronniers et de Mandarinier : (*C.limon* et *C. reticulata*)

D'après la figure n°3.4 on constate que les bons cals formés sont obtenus avec les citronniers (80±5%) et cela avec le traitement hormonal BAP, même avec le mandarinier de Blida (MB) mais avec un petit pourcentage (37%).



**Figure n°3.4** : variation de l'importance des cals (groupe des Citronniers et Mandarinier)

Contrairement au traitements hormonaux 2.4D ou BAP+2.4D qui ont donné des cals moins importants avec presque toutes les variétés. Selon GAJ [108], Le choix

des hormones de croissance détermine deux choses, la capacité de réponce des explants et la réaction morphogénique, et généralement l'embryogénèse somatique est induite avec la présence des auxines seule ou en combinaison avec les cytokinines.

En seconde remarque, GROSSER et GMITTER [109] mentionnent que les auxines sont généralement utilisées pour stimuler l'induction des cals embryogènes. Le 2.4D est l'auxine préféré à ce propos. Les cals embryogènes des *Citrus* peuvent être considérés habitués et maintenus indéfiniment dans un milieu sans hormones de croissance. Cela simplifie les besoins en hormones de croissance dans la culture des protoplastes des *Citrus* et peut réduire les variations somaclonales liées aux effets des auxines.

Et enfin, le traitement hormonal témoin n'a pas donné de cals avec toutes les variétés.

#### 3.4.2- Groupe des orangers : (*C.senensis*)

Concernant le deuxième groupe des orangers, on constate que les bons cals sont généralement obtenus avec le traitement hormonal BAP, et qui diffère d'une variété à une autre avec une valeur moyenne de 85 %. (Figure n° 3.5)

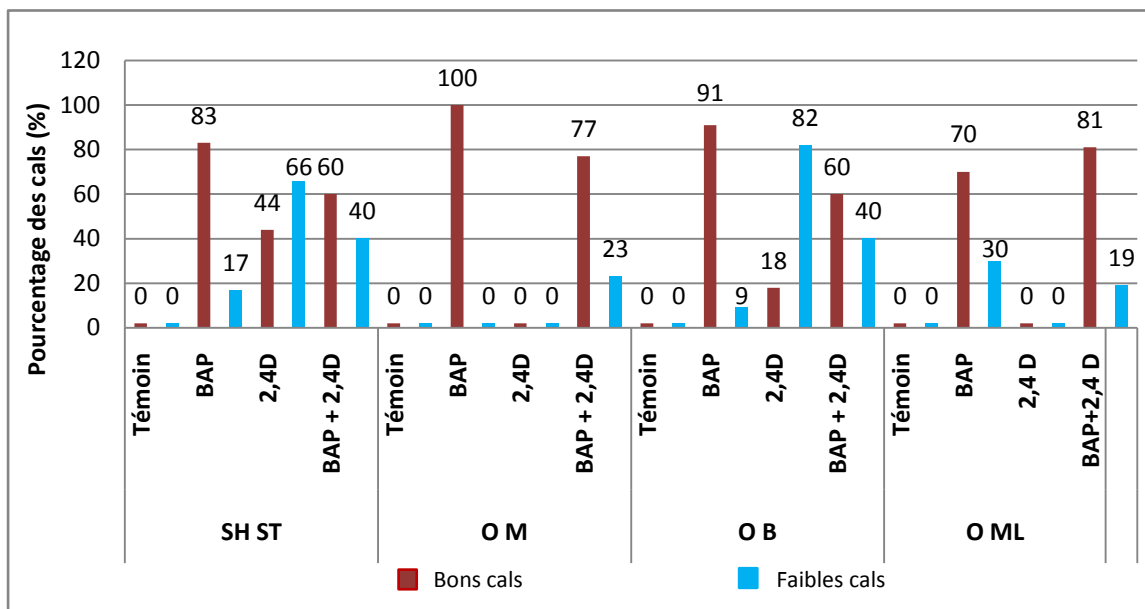


Figure n°3.5 : variation de l'importance des cals (groupe des Orangers)

Aussi on remarque des bons cals qui sont formés avec le traitement hormonal BAP+2.4D (70%), et l'hormone 2.4D a donné un pourcentage moindre qui est de l'ordre de 30 %.

RAEMAKERS et *al.*, [99] citent que parmi les auxines, le plus couramment utilisé était le 2.4D à 49%. Malgré cela, on constate que des faibles cals sont enregistrés avec le traitement hormonal 2.4D.

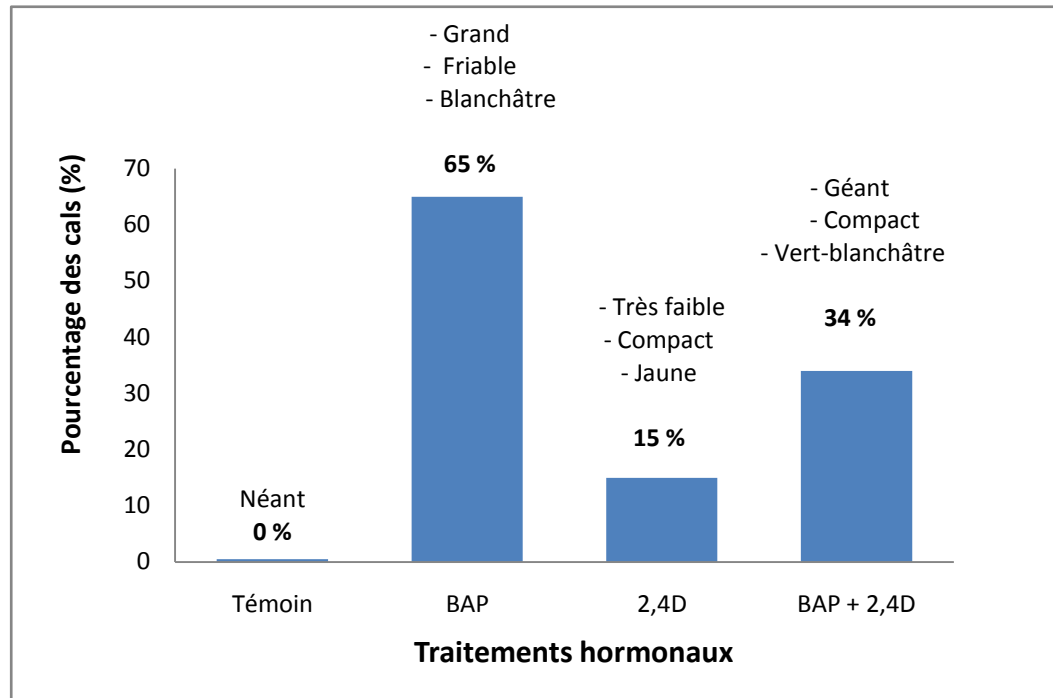
Aussi des cals faibles sont obtenus avec la combinaison hormonale BAP+2.4D. JAYANTHI et MANDAL [110] ont montré que chez *Tylophora indica*, le 2,4-D utilisé seul inhibe la formation des embryons somatiques sur cals, mais lorsqu'il est associé à la BAP ou à la kinétine (0,5 à 3 mg l<sup>-1</sup>), on obtient jusqu'à 70 % de cals qui forment les embryons avec en moyenne 61 ± 3 embryons par cal.

Et selon les travaux de YAMADA et *al.*, [111], Chez l'Aubergine, *Solanum melongena* citent qu'il existe à la fois des cultivars embryogènes et d'autres qui ne produisent dans les mêmes conditions que des cals non organogènes.

### 3.5 Caractéristiques des cals selon les traitements hormonaux :

Concernant ce paramètre qui combine entre la taille, la nature et la couleur des cals (Figure n° 3.6), en comparaison entre les traitements hormonaux, on constate que le traitement BAP qui a provoqué le pourcentage le plus élevé de callogénèse (65%), avec une texture friable et une couleur blanchâtre est la forme idéale des cals embryogènes chez les agrumes. Selon PIATTI [43], les cals mis à l'abri de la lumière sont généralement de couleur beige à jaune, de texture friable à consistance molle, caractéristiques morphologiques des cals embryogènes. BUVAT [112] mentionne qu' en présence de différentes concentrations d'hormones de croissance, des cals noduleux, sont définis comme des masses cellulaires denses et indépendantes formant des unités sphériques cohésives.





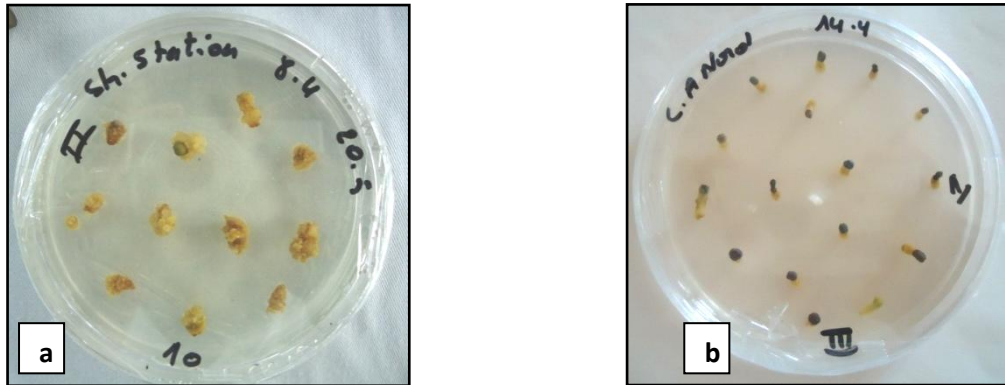
**Figure n°3.6 :** Caractéristiques des cals selon les traitements hormonaux

En deuxième classe, le traitement 2.4D+BAP a donné des résultats moyens pour le pourcentage de callogénèse, mais les cals formés même s'ils sont géants, sont compacts et durs et d'une couleur vert-blanchâtre, qui ressemblent à un tissu végétal vert. D'après EL YACOUBI et *al.*, [113], la réussite du processus callogène est liée au type de phytohormones utilisées dans le milieu de culture, à leurs concentrations et leurs combinaisons. Aussi la combinaison de la BAP avec le 2,4-D renforce l'effet callogène de l'auxine et permet d'obtenir une prolifération rapide des cellules d'où des cals volumineux.

Les cals formés avec le traitement hormonal 2.4D sont de très petite taille par rapport à ceux formés avec les autres hormones. Aussi, ils ont une texture compacte et une couleur presque jaune à brunâtre qui ne ressemble pas à la forme embryonnaire des cals chez les agrumes. Parmi les facteurs éventuels de la perte à l'aptitude à l'embryogenèse ce sont souvent la polyploïdie et l'aneuploïdie, fréquemment observées dans des milieux contenant 2.4D et lait de coco [26].

Le témoin qui est le traitement sans hormone n'a rien donné comme forme callogène. OUKARA [114] constate après quelques semaines de culture, un

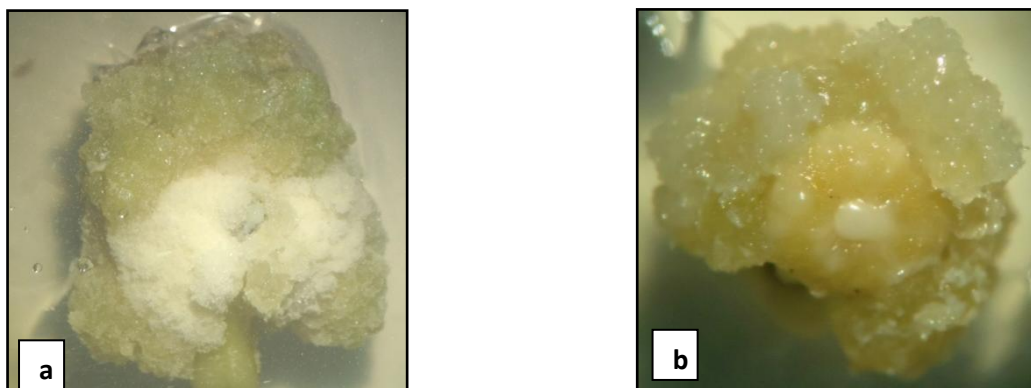
brunissement des tissus, accompagné d'un brunissement de milieu, suivi d'un ralentissement de la croissance des cals. C'est l'émission de composés bruns de nature phénolique qui ont par la suite un effet inhibiteur sur l'activité cellulaire et la croissance des cals.



**Figure n°3.7** : Explants des variétés après la mise en culture

**a** : brunissement après formation des cals en milieu BAP(II) de la variété Orange Shamouti de Station

**b** : nécrose du stigmate en milieu BAP+ 2.4D(III) de la variété citronnier Afrique du nord



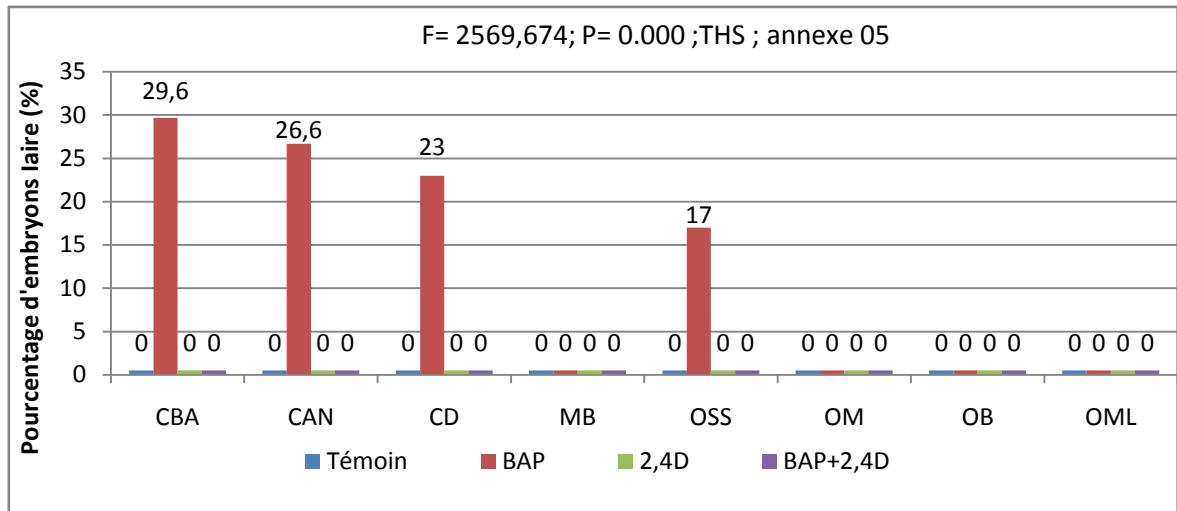
**Figure n°3.8** : Cals de nature différente

**a** : Cal jaune-verdâtre en milieu BAP+2.4D (III) de la variété orange Miliah

**b** : Cal embryogène en milieu BAP (II) de la variété Shamouti de station

### 3.6 Pourcentage d'Embryons primaires par variété

Pour ce paramètre d'embryogénèse des explants, on enregistre une différence très hautement significative, et cela est confirmé par le tableau de l'analyse de la variance ( $P=0.000$ , Annexe 06).



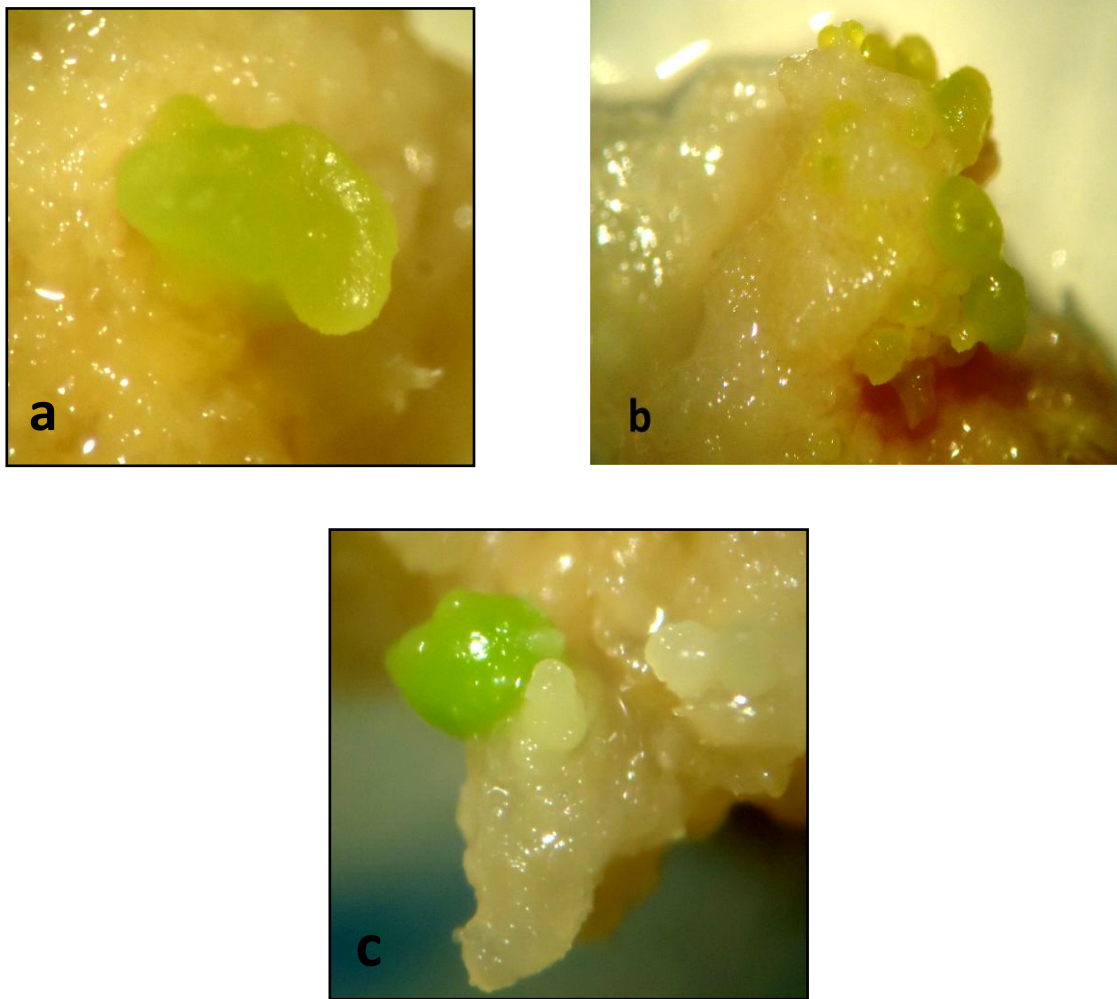
**Figure n°3.9 :** Pourcentage d'Embryons primaires par variété  
CBA (Citronnier Beni abbas); CAN (Citronnier Afrique du Nord); CD (Citronnier Dellys) ; OSS (Orange Shamouti de Station)

On constate que parmi les variétés testées, seulement quatre variétés ont donné des embryons primaires (Figure n° 3.9), à savoir les trois variétés de citronniers Beni Abbes (CBA), Afrique du nord (CAN) et Dellys (CD) avec des pourcentages qui varient de 23 à 29%, et une seule variété d'oranger Shamouti Station (OSS) avec un pourcentage d'embryons moindre (17%). Ce résultat est donné avec un seul traitement hormonal qui est la BAP. Cela confirme les résultats de RAMAN et *al.*, [115] qui citent que la présence de cytokinine seule peut induire la formation d'organes chez les *Citrus*.

Les trois autres variétés d'oranger (O. Meski (OM), O. Bey(OB), O.Miliah (OML)) et la variété de mandarinier de Blida(MB) n'ont pas donné d'embryons avec les traitements hormonaux, même avec la BAP qui a donné des embryons avec d'autres variétés.

Tandis que VASIL et THORPE [116], mentionnent que le 2.4.D et l'acide gibbérellique avec une concentration faible de ce dernier par rapport à celle des auxines, sont utilisés pour l'induction des embryons.

Les traitements hormonaux 2.4D et le témoin n'ont pas donné des embryons avec toutes les variétés.



**Figure n°3.10:** Cals embryogènes sur un milieu avec BAP(II)

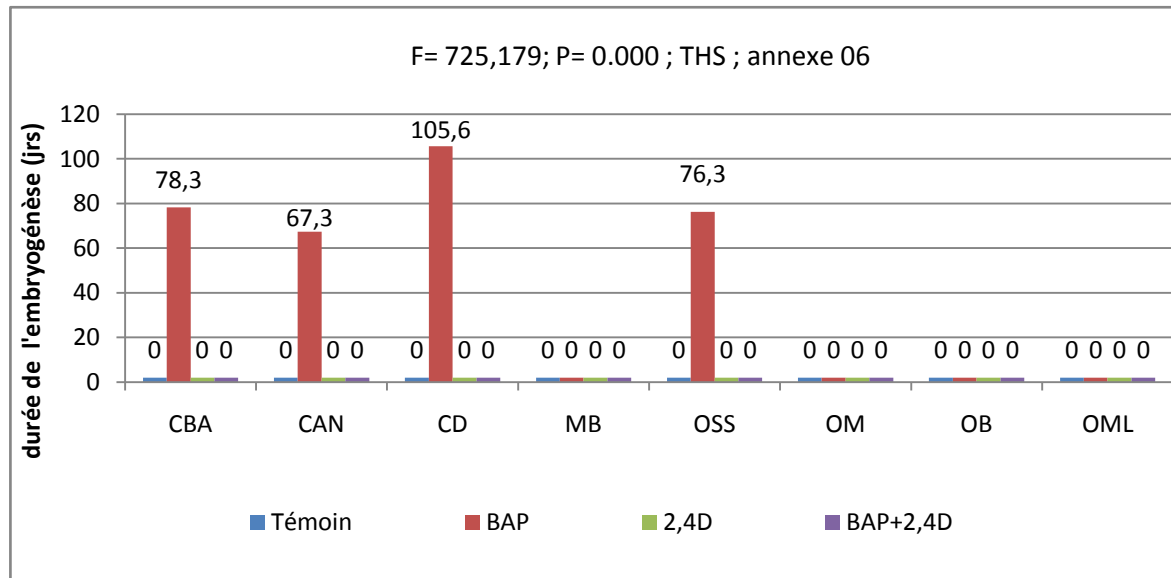
**a :** 1 embryon/cal (citronnier Afrique du nord);

**b :** plusieurs embryons /cal (citronnier Beni Abbès) ;

**c :** 1 embryon /cal (oranger Shamouti de Station)

### 3.7 Durée de déclenchement de l'embryogénèse

Pour la durée de déclenchement de l'embryogénèse (Figure n°3.11), les résultats obtenus montrent une différence très hautement significative entre les traitements hormonaux et ceux du facteur variétal ( $P=0.000$ , Annexe 07).



**Figure n°3.11** : Durée de déclenchement de l'embryogénèse

CBA (Citronnier Beni abbas); CAN (Citronnier Afrique du Nord); CD (Citronnier Dellys) ; OSS (Orange Shamouti de Station)

La durée d'embryogénèse la plus lente chez les quatre variétés qui ont donné des embryons, est enregistrée avec la variété de citronnier Dellys (CD) (105 jrs). Puis avec une durée moyenne chez les variétés C. Beni Abbas (CBA) et O. Shamouti Station (OSS) (78 et 76 jrs respectivement). Et enfin une durée moins lente notée chez la variété C. Afrique du Nord (CAN) (67 jrs), et cela avec un seul traitement hormonal qui est le BAP. Cela confirme les résultats de MEZIANE et *al.* [96], qui notent que l'embryogénèse est produite après 38 à 150 jours chez la plupart des génotypes testés. CARIMI et *al.*, [78] mentionnent que le développement des cals est observé sur la base de style 4 semaines après le traitement initial, et l'embryogénèse se produit après 2 à 3 mois plus tard.

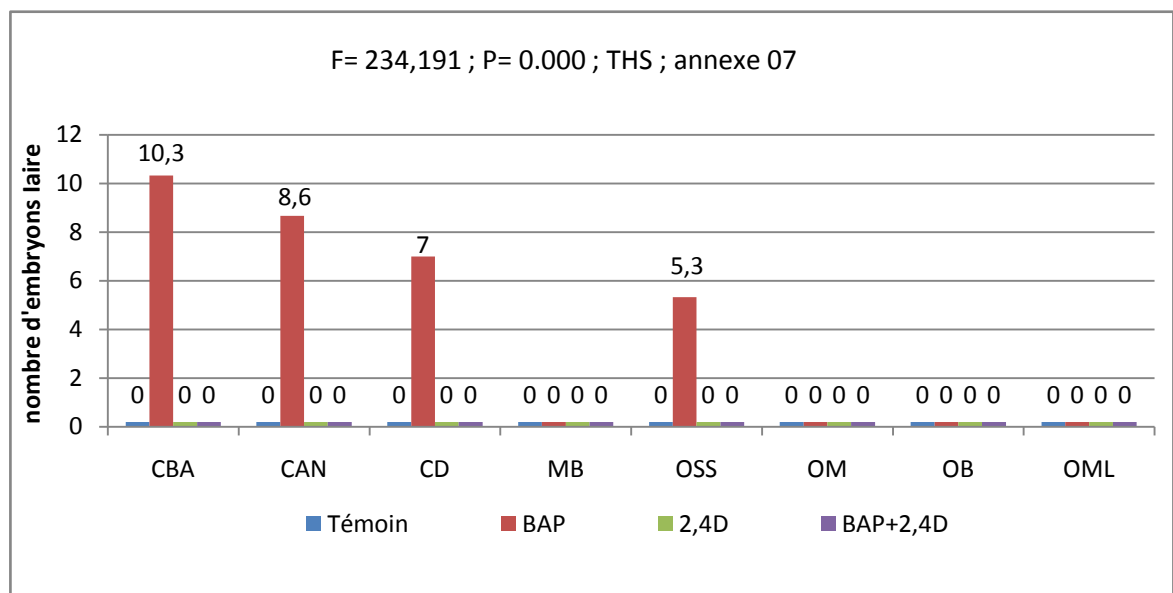
VASIL et THORPE [116], citent qu'une embryogénèse continue est maintenue indéfiniment dans le milieu d'induction avec 2.4D ou même en un milieu sans hormones de croissance par une sélection des cals embryogènes ou des embryons qui ont produit des embryons secondaires occasionnellement.

Ainsi, en culture *in vitro*, en plus de la nature et de la concentration des phytohormones utilisées, l'espèce végétale est l'un des facteurs à prendre en considération, elle serait liée au facteur génétique pouvant déterminer le comportement des explants mis en culture [30].

BOURGKARD et *al.*, [117] signalent que l'activité embryogène des cals ne se maintient pas au-delà de 12 semaines de culture.

### 3.8 Nombre d'Embryons primaire par Variété

Les résultats enregistrés pour ce paramètre (Figure n°3.12), montrent une différence très hautement significative pour les traitements des deux facteurs selon le tableau de l'analyse de la variance ( $P=0.000$ , Annexe 08).



**Figure n°3.12 : Nombre d'Embryons primaire par variété**

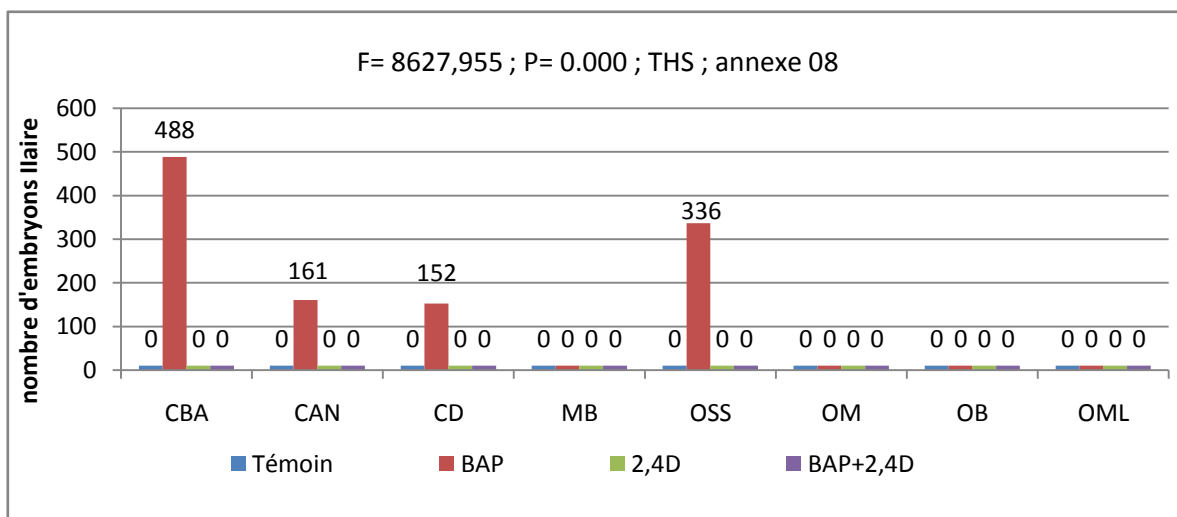
CBA (Citronnier Beni abbas); CAN (Citronnier Afrique du Nord); CD (Citronnier Dellys) ; OSS (Orange Shamouti de Station)

On constate que le nombre d'embryons primaires varie à travers les quatre variétés qui ont donné des embryons, avec le plus grand nombre chez la variété C. Beni Abbas (CBA) (10 embryons), et en deuxième lieu, on peut classer les variétés C. Afrique du Nord et C. Dellys (CD) (8 et 7 embryons respectivement). Le faible nombre d'embryons est enregistré avec la variété d'orange Shamouti Station (OSS) (5 embryons). Ces résultats positifs obtenus sont seulement avec le traitement hormonal BAP. La totipotence des cellules isolées paraît ne pouvoir s'exprimer que dans des conditions particulières [26].

Les traitements hormonaux 2.4D seul et en combinaison avec le BAP n'ont pas donné des cals et donc pas d'embryons produits, même si TISSERAT, 1979 in [118] mentionne que l'induction des embryons somatiques est déclenchée sur un milieu de culture contenant du 2,4 D et de la BAP, avec une concentration inférieure à celle utilisée lors de la callogénèse. Aussi VASIL et THORPE [116] citent que l'implication des auxines, spécialement le 2.4D dans la callogénèse en des embryons est maintenant définitivement établi.

### 3.9 Nombre d'Embryons secondaires par Variété

Le nombre d'embryons secondaires obtenus par variété révèle une différence très hautement significative des deux facteurs étudiés (variétés et hormones de croissance) selon le tableau de l'analyse de la variance ( $P=0.000$ , Annexe 09).



**Figure n°3.13 :** Nombre d'Embryons secondaires par Variété

CBA (Citronnier Beni abbas); CAN (Citronnier Afrique du Nord); CD (Citronnier Dellys) ; OSS (Orange Shamouti de Station)

Il peut arriver que des embryons de seconde génération se développent « spontanément » à partir d'une première génération d'embryoïdes somatique ou androgénétiques [119].

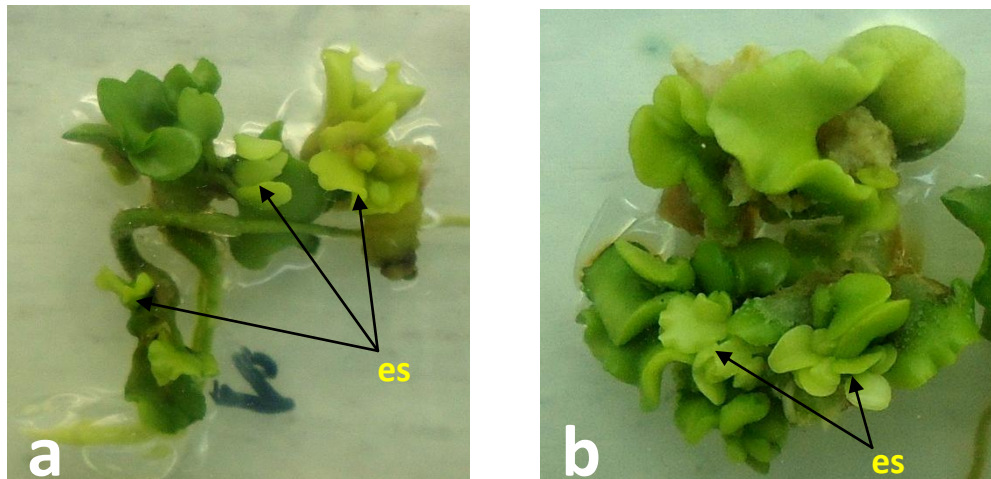
D'après la figure n°3.13, on constate que le nombre d'embryons secondaires le plus élevé est obtenu avec la variété de citronnier Beni Abbes (CBA) (488 embryons), suivi par la variété d'oranger qui a donné des embryons Shamouti de Station (OSS) avec 336 embryons secondaires, et enfin les deux variétés de citronnier restantes C. Afrique du Nord (CAN) et Dellys (CD) qui ont donné un nombre faible d'embryons secondaires qui de 161 et 152 respectivement. Ceci est obtenu avec un seul traitement hormonal qui est la BAP. Cela confirme les essais préliminaires obtenus par CARIMI et *al.*, [78] utilisant des doses différentes de BAP (0.5, 4.5 et 45  $\mu$ M) qui ont donné une capacité de régénération à partir de styles (3.4, 8.1 et 6.3% respectivement), tandis que les styles mis en culture en ANA et 2.4D n'ont pas donné d'embryons.

Les trois autres traitements hormonaux n'ont pas donné d'embryons. L'embryogénèse somatique dans la pratique ne s'exprime d'une manière reproductible que chez certaines espèces dans des conditions définies, à partir de certains tissus, sur un milieu de culture approprié [26].

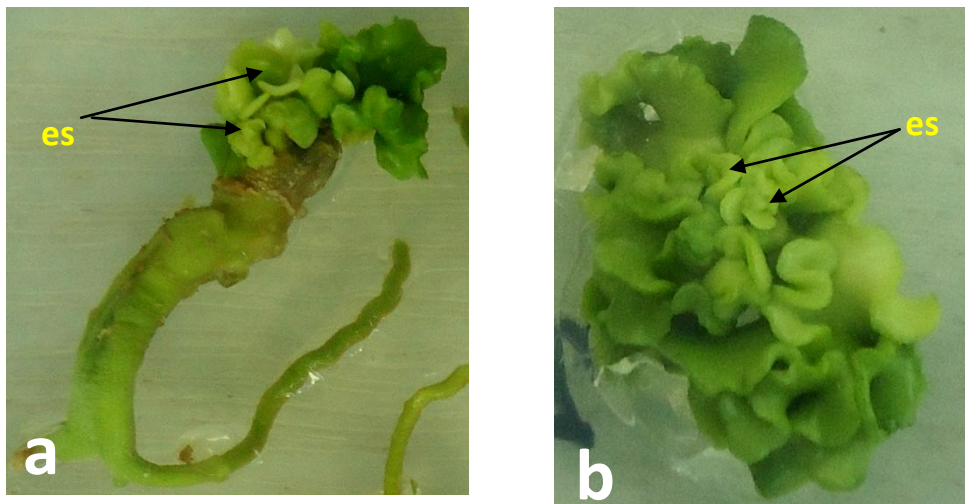
Il a été suggéré par HALPERIN [120] que c'est pendant la première phase de l'initiation des cultures que certaines cellules pouvaient acquérir la capacité d'exprimer leur totipotence. Cette induction n'affecterait pas nécessairement toutes les cellules ; de sorte que la culture comprendrait un mélange de cellules induites et d'autres non induites.

L'aptitude à l'embryogénèse somatique peut se perdre au cours des repiquages successifs. La diminution de la concentration en auxine (2.4D en particulier) dans un second milieu pourrait avoir précisément pour objet d'éviter cette réversion [26].





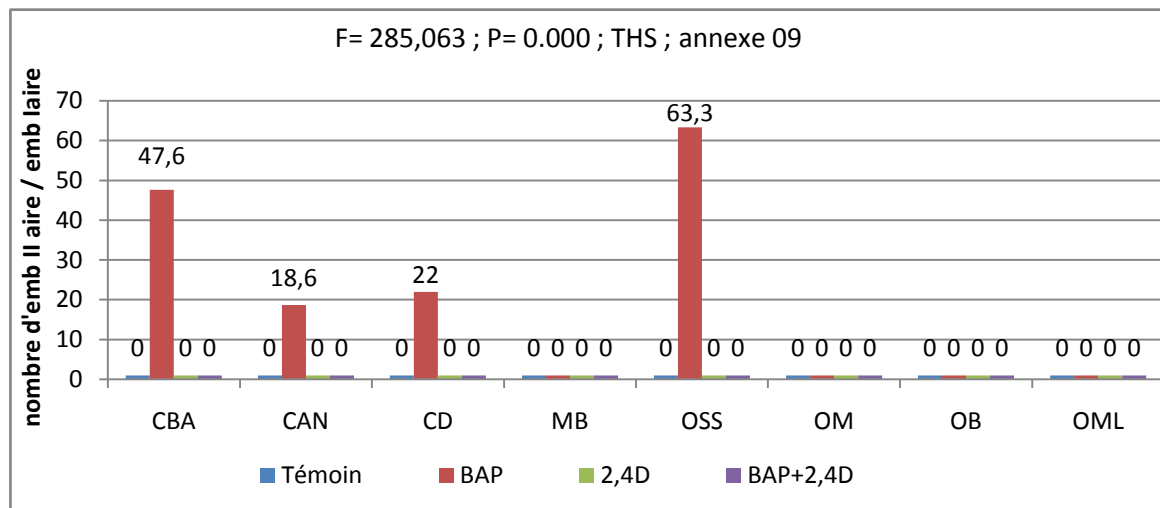
**Figure n°3.14** : Photos des embryons secondaires avec le milieu BAP  
**a** : citronnier Dellys; **b** : citronnier Afrique du Nord  
**es** : embryon secondaire (d'une couleur plus claire)



**Figure n°3.15** : Photos des embryons secondaires avec le milieu BAP  
**a** : Citronnier Beni Abbes ; **b** : Oranger Shamouti de Station  
**es** : embryon secondaire (d'une couleur plus claire)

### 3.10 Nombre d'embryons secondaires par embryons primaires

Pour ce paramètre qui le rapport entre le nombre d'embryons secondaires par rapport au nombre d'embryons primaires, le tableau de l'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative pour les deux facteurs étudiés et aussi l'effet d'interaction entre eux ( $P=0.000$ , Annexe 10).



**Figure n°3.16** : Nombre d'embryons secondaires par embryons primaires  
CBA (Citronnier Beni abbas); CAN (Citronnier Afrique du Nord); CD (Citronnier Dellys) ; OSS (Orange Shamouti de Station)

Selon les résultats présentés par la figure n° 3.16, on remarque que le rapport d'embryons secondaires par embryons primaire le plus élevé est enregistré avec la seule variété d'oranger qui a donné d'embryons Shamouti de Station (OSS) (63 embryons), et en deuxième niveau, on trouve la variété de citronnier Beni Abbes (CBA) avec un rapport de 47 embryons. En dernière classe, les deux variétés de citronnier C. Afrique du nord (CAN) et C. Dellys (CD) ont donné un rapport moyen de 20 embryons, et ce avec le seul traitement hormonal qui donné des embryons qui est le BAP. Parmi 34 génotypes testés de 7 espèces différentes des agrumes, seulement 14 génotypes qui ont donnés des embryons somatiques [96].

Les traitements hormonaux témoin, 2.4D et BAP+2.4D n'ont pas produit d'embryons avec toutes les variétés. Selon LAKSHMANAN and TAJI [121] dans quelques cas, l'addition des cytokinines inhibent l'induction des embryons

somatiques provoqué par les auxines, e.g : embryogénèse somatique directe chez le petit pois, le soja et *Coronilla varia*.

Les résultats ne sont pas tous aisément reproductibles [51]. L'importance des facteurs génétiques demeure toujours essentielle, celle-ci s'observe au niveau de la famille des Ombellifères, de l'espèce et même du cultivar. Les premiers résultats avaient surtout été obtenus d'une manière aisément reproductible avec la Carotte sauvage, chez la Carotte cultivée, des différences variétales dans l'aptitude à l'embryogénèse somatique ont été constatées par plusieurs auteurs. [51]

Ce sont les conditions ultérieures de la culture qui favorisaient les unes ou les autres. On pourrait peut-être expliquer ainsi le rôle de la suppression de l'auxine du milieu lorsque cette suppression déclenche l'embryogénèse ou la caulogénèse [26].



**Figure n°3. 17** : Plantules régénérées

**a** : citronnier Afrique du Nord; **b** : la variété de citronnier Dellys

## CONCLUSION

L'embryogénèse somatique à partir de la culture de style et de stigate est une technique récente mise au point par CARIMI *et al.*, [9]. Elle apparaît comme un puissant outil qui permet de régénérer un taux élevé de plants d'agrumes indemnes de maladies et génétiquement identiques aux plantes mères [10].

Cette technique permet de réaliser l'objectif principal de notre travail qui est l'assainissement et la régénération de 8 variétés d'agrumes appartenant à 3 espèces : *C.sinensis*, *C. limon* et *C.reticulata*. Notre étude a été menée dans des conditions expérimentales du laboratoire de l'institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV).

Au terme de notre étude et à la lumière des résultats obtenus, nous pouvons formuler un certain nombre de conclusions.

La durée de déclenchement de la callogénèse après la mise en culture des explants, diffère d'une variété à une autre, où la petite durée est enregistrée avec l'hormone de croissance BAP avec toutes les variétés surtout avec les citronniers (5 à 7 jrs), avec des différences de 1 à 3 jours. Le mandarinier de Blida présente une durée plus importante, cependant les autres traitements hormonaux ont donné des durées plus importantes surtout la combinaison BAP + 2.4D.

Concernant le pourcentage des explants callés, le traitement hormonal BAP provoque la callogénèse dans toutes les variétés avec des pourcentages plus élevés des variétés C. Afrique du Nord (CAN), C. Dellys (CD) et O. Shamouti Station (OSS), avec des faibles pourcentages enregistrées avec le traitement hormonal 2.4D à raison de 15 %.

Nous avons constaté que la nature, la taille et la texture des cals varie selon le traitement hormone, où les caractères d'un cal embryogène sont obtenus avec l'hormone BAP, et qui sont des gros cals, friables et blanchâtres, mais les traitements hormonaux 2.4D seul et la combinaison BAP+2.4D ont donné des cals très grands mais qui sont non-embryogènes, parce qu'ils sont compacts et plus durs.

Le pourcentage obtenu d'embryons primaires par variété, diffère des trois variétés de citronniers, qui ont donné des embryons avec un pourcentage moyen de 23 à 29 %. Aussi une variété d'oranger Shamouti de Station (OSS) a permis d'avoir un pourcentage de 17%, et cela seulement avec l'hormone de croissance BAP.

Pour la durée de déclenchement de l'embryogénèse, les quatre variétés ont présenté des durées différentes : 105 jours pour la variété citronnier Dellys, 77 jours en moyenne des variétés du citronnier Beni Abbes et orange Shamouti de Station, et en fin la variété citronnier Afrique du nord avec une durée de 67 jours.

Le nombre d'embryons primaires par variété est généralement faible pour toutes les variétés : 10 embryons pour citronnier Beni Abbes, 8 pour citronnier Afrique du nord, 7 pour citronnier Dellys et 5 embryons pour la variété orange Shamouti de Station.

Le nombre d'embryons secondaires par variété est remarquable : 488 embryons pour citronnier Beni Abbes, 161 pour citronnier Afrique du nord, 152 pour la variété citronnier Dellys et la variété d'oranger Shamouti de Station avec 336 embryons.

Le rapport nombre d'embryons secondaires par chaque embryon primaire est plus élevé chez la variété d'oranger Shamouti de Station (63 embryons), puis viennent les variétés de citronnier Beni Abbes 47 embryons, citronnier Dellys et Afrique du Nord 22 et 18 embryons respectivement.

Tous les explants des différentes variétés ont formé des cals avec différents pourcentages selon les hormones de croissance. Mais en phase d'embryogénèse, seules les trois variétés de citronnier et un génotype d'oranger ont produit des embryons primaires et secondaires avec l'hormone de croissance BAP utilisé seul.

D'autres investigations doivent d'être menées pour évaluer le potentiel embryogène de tous les génotypes autochtones algériens et les génotypes importants de point de vue économique, et orienter d'autres études aux variétés qui ont donné des résultats négatifs et le groupe des navels qui est génétiquement instable. Et espérons de pratiquer cette technique dans la multiplication du matériel de base avec les variétés à résultat positif.

La maîtrise de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate et son intégration dans les programmes de certification, permettra la valorisation et la préservation de notre patrimoine agrumicole et la relance de l'agrumiculture dans notre pays.









### Annexe 04: Importance des cals

(B : bon cal F : faible cal)

Importance des cals (%)					
Hormone		I	II	II'	III
Variété					
C. Beni Abbes	B	0	67	0	0
	F	0	33	0	0
C. Afrique du nord	B	0	86	0	0
	F	0	14	100	0
C. Dellys	B	0	78	0	100
	F	0	22	0	0
M. Blida	B	0	37	0	27
	F	0	63	0	73
O. Shamouti Station	B	0	83	44	60
	F	0	17	66	40
O. Meski	B	0	100	0	77
	F	0	00	0	23
O. Bey	B	0	91	18	60
	F	0	9	82	40
O. Miliah	B	0	70	0	81
	F	0	30	0	19

### Annexe 05 : Caractéristiques des cals selon les traitements hormonaux :

Traitement	Témoin	BAP	2.4D	2.4D+BAP
Paramètres				
Pourcentage des cals (%)	0	65	15	34
Caractéristiques des cals	Néant	- Grand - Friable - Blanchâtre	- Très faible - Compact - Jaune	- Géant - Compact - Vert-blanchâtre

## Annexe 06 : Pourcentage d'embryons primaires par variété

Analyse de la variance

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	6360,99	95	66,958				
VAR.FACTEUR 1	936,906	7	133,844	2569,675	0,000		
VAR.FACTEUR 2	2610,031	3	870,011	16703,39	0,000		
VAR.INTER F1*2	2810,719	21	133,844	2569,674	0,000		
VAR.RESIDUELLE 1	3,333	64	0,052			0,228	7,58%

### Tableau des moyennes et des groupes homogènes

F1 X F2	MOYENNE S	GROUPES HOMOGENES				
CBA BAP	29,667	A				
CAN BAP	26,667		B			
CD BAP	23			C		
OSS BAP	17				D	
CBA 2.4D	0					E
CAN BAP+2.4D	0					E
CD TM	0					E
OSS BAP+2.4D	0					E
OMS TM	0					E
CBA BAP+2.4D	0					E
CAN TM	0					E
MB BAP+2.4D	0					E
OSS TM	0					E
CD 2.4D	0					E
CBA TM	0					E
CD BAP+2.4D	0					E
MB TM	0					E
CAN 2.4D	0					E
OSS 2.4D	0					E
OML BAP	0					E
OML 2.4D	0					E
MB BAP	0					E
MB 2.4D	0					E
OB BAP	0					E
OB 2.4D	0					E
OML BAP+2.4D	0					E
OMS BAP	0					E
OMS 2.4D	0					E
OB BAP+2.4D	0					E
OML TM	0					E
OMS BAP+2.4D	0					E
OB TM	0					E

## Annexe 07 : Durée de déclenchement de l'embryogénèse

Analyse de la variance

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	73055,48	95	769,005				
VAR.FACTEUR 1	10681,06	7	1525,866	725,178	0,000		
VAR.FACTEUR 2	30196,53	3	10065,51	4783,701	0,000		
VAR.INTER F1*2	32043,23	21	1525,868	725,179	0,000		
VAR.RESIDUELLE 1	134,664	64	2,104			1,451	14,17%

Tableau des moyennes et des groupes homogènes

F1 X F2	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES			
CD BAP	105,667	A			
CBA BAP	78,333		B		
OSS BAP	76,333		B		
CAN BAP	67,333			C	
CBA 2.4D	0				D
CAN BAP+2.4D	0				D
CD TM	0				D
OSS BAP+2.4D	0				D
OMS TM	0				D
CBA BAP+2.4D	0				D
CAN TM	0				D
MB BAP+2.4D	0				D
OSS TM	0				D
CD 2.4D	0				D
CBA TM	0				D
CD BAP+2.4D	0				D
MB TM	0				D
CAN 2.4D	0				D
OSS 2.4D	0				D
OML BAP	0				D
OML 2.4D	0				D
MB BAP	0				D
MB 2.4D	0				D
OB BAP	0				D
OB 2.4D	0				D
OML BAP+2.4D	0				D
OMS BAP	0				D
OMS 2.4D	0				D
OB BAP+2.4D	0				D
OML TM	0				D
OMS BAP+2.4D	0				D
OB TM	0				D

## Annexe 08 : Nombre d'embryons primaire par Variété

Analyse de la variance

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	689,958	95	7,263				
VAR.FACTEUR 1	102,458	7	14,637	234,19	0,000		
VAR.FACTEUR 2	276,125	3	92,042	1472,667	0,000		
VAR.INTER F1*2	307,375	21	14,637	234,191	0,000		
VAR.RESIDUELLE 1	4	64	0,063			0,25	25,53%

Tableau des moyennes et des groupes homogènes

F1 X F2	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES				
CBA BAP	10,333	A				
CAN BAP	8,667		B			
CD BAP	7			C		
OSS BAP	5,333				D	
CBA 2.4D	0					E
CAN BAP+2.4D	0					E
CD TM	0					E
OSS BAP+2.4D	0					E
OMS TM	0					E
CBA BAP+2.4D	0					E
CAN TM	0					E
MB BAP+2.4D	0					E
OSS TM	0					E
CD 2.4D	0					E
CBA TM	0					E
CD BAP+2.4D	0					E
MB TM	0					E
CAN 2.4D	0					E
OSS 2.4D	0					E
OML BAP	0					E
OML 2.4D	0					E
MB BAP	0					E
MB 2.4D	0					E
OB BAP	0					E
OB 2.4D	0					E
OML BAP+2.4D	0					E
OMS BAP	0					E
OMS 2.4D	0					E
OB BAP+2.4D	0					E
OML TM	0					E
OMS BAP+2.4D	0					E
OB TM	0					E

## Annexe 9 : Nombre d'embryons secondaires par Variété

Analyse de la variance

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1081834	95	11387,72				
VAR.FACTEUR 1	179299,9	7	25614,27	8627,964	0,000		
VAR.FACTEUR 2	364444,7	3	121481,6	40920,11	0,000		
VAR.INTER F1*2	537899,1	21	25614,24	8627,955	0,000		
VAR.RESIDUELLE 1	190	64	2,969			1,723	4,84%

### Tableau des moyennes et des groupes homogènes

F1 X F2	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES				
CBA BAP	488,667	A				
OSS BAP	336,333		B			
CAN BAP	161			C		
CD BAP	152,333				D	
CBA 2.4D	0					E
CAN BAP+2.4D	0					E
CD TM	0					E
OSS BAP+2.4D	0					E
OMS TM	0					E
CBA BAP+2.4D	0					E
CAN TM	0					E
MB BAP+2.4D	0					E
OSS TM	0					E
CD 2.4D	0					E
CBA TM	0					E
CD BAP+2.4D	0					E
MB TM	0					E
CAN 2.4D	0					E
OSS 2.4D	0					E
OML BAP	0					E
OML 2.4D	0					E
MB BAP	0					E
MB 2.4D	0					E
OB BAP	0					E
OB 2.4D	0					E
OML BAP+2.4D	0					E
OMS BAP	0					E
OMS 2.4D	0					E
OB BAP+2.4D	0					E
OML TM	0					E
OMS BAP+2.4D	0					E
OB TM	0					E

## Annexe 10 : Nombre d'embryons secondaires par embryons primaires

Analyse de la variance

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	19292,49	95	203,079				
VAR.FACTEUR 1	3180,246	7	454,321	285,064	0,000		
VAR.FACTEUR 2	6469,535	3	2156,512	1353,105	0,000		
VAR.INTER F1*2	9540,713	21	454,32	285,063	0,000		
VAR.RESIDUELLE 1	102	64	1,594			1,262	26,64%

Tableau des moyennes et des groupes homogènes

F1 X F2	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES				
		A	B	C	D	E
OSS BAP	63,333	A				
CBA BAP	47,667		B			
CD BAP	22			C		
CAN BAP	18,667				D	
CBA 2.4D	0					E
CAN BAP+2.4D	0					E
CD TM	0					E
OSS BAP+2.4D	0					E
OMS TM	0					E
CBA BAP+2.4D	0					E
CAN TM	0					E
MB BAP+2.4D	0					E
OSS TM	0					E
CD 2.4D	0					E
CBA TM	0					E
CD BAP+2.4D	0					E
MB TM	0					E
CAN 2.4D	0					E
OSS 2.4D	0					E
OML BAP	0					E
OML 2.4D	0					E
MB BAP	0					E
MB 2.4D	0					E
OB BAP	0					E
OB 2.4D	0					E
OML BAP+2.4D	0					E
OMS BAP	0					E
OMS 2.4D	0					E
OB BAP+2.4D	0					E
OML TM	0					E
OMS BAP+2.4D	0					E
OB TM	0					E

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Houjiu W., (2000)** .Situation et perspectives de l'industrie de transformation des agrumes en Chine, Symposium sur les agrumes, Chine. ed. FAO.
- 2- **Economos C et Clay WD., (1998)**. Nutritional and health benefits of Citrus fruits, the twelfth session of the intergovernmental group on Citrus fruits, Valencia, Spain. 22 to 25 September 1998.
- 3- **Anonyme, (2012)**. Rapport statistique annuelle des agrumes: frais et transformés. ed : FAO.
- 4- **Imbert E., (2004)**. Les agrumes de Méditerranée - Leaders mondiaux du marché du frais, CIRAD. FruiTrop, n° 117, p.4.
- 5- **Anonyme, (2013)**. DSASI : Direction des statistiques et des systèmes d'information. Ministère de l'agriculture et du développement rural. Algérie
- 6- **Anonyme, (2014a)**. DSASI : Direction des statistiques et des systèmes d'information. Ministère de l'agriculture et du développement rural. Algérie
- 7- **Roistacher CN., (1977)**. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood. Budwood selection, indexing and thermotherapy. In: *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 3, pp 965-972.
- 8- **Ollitrault P., Luro F. (1995)**. Revue : Fruits, vol (50), n°4, pp 267-279.
- 9- **Carimi F., De Pasquale F et Crescimanno FG., (1994)**. Somatic embryogenesis from styles of different cultivars of *Citrus limon* (L).Ed. Brum. *Australian Journal of Botany*, n°42. pp 587- 444.
- 10- **D'Onghia AM., Carimi F., DePasquale F., Djelouah K et Martelli GP., (2000)**. Somatic embryogenesis from style and stigma: a new technique for the sanitation, and Safe exchange of Citrus germplasm .In:*Proc.19<sup>th</sup> ISC Congress* (Florida 2000). pp 147-149.
- 11- **Loussert R., (1989)**. Les agrumes, arboriculture. Tome I. d : Tec et Doc. Paris, 113p.
- 12- **Gallais A et Bannerot H., (1992)**. Amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et critères de sélection, ed : Quae. Paris .768p.
- 13- **Teuscher E., Anton R et Lobsetein A., (2005)**. Plantes aromatique : épices, aromates, condiments et huiles essentiels. ed : Tec et Doc; Italie. pp 77-88.
- 14- **Hadj Sahraoui M., (2007)**. L'agrumiculture en Algérie. Rev. Agromagazine de l'agriculture et de l'agro-industrie. (1).pp 20-22.



- 15- **Boullard B., (1997)**. Plantes et champignons. ed : Estem, Rousselet. Paris .875 p.
- 16- **Arora RK et Rao VR., (1997)**. Tropical Fruits in Asia. Diversity, maintenance, Conservation and Use., India.
- 17- **Rebour H., (1950)**. Les agrumes en Afrique du Nord. Ed. Union des Syndicats des producteurs d'agrumes, Alger, 502 p.
- 18- **Swingle W.T., (1948)**. The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. In: *citrus industry*. Chap IV. Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles.
- 19- **Sadok B., (1983)**. Morphogenèse et possibilités nouvelles de multiplication végétative *in vitro* chez les citrus .thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, université de Tunis.136 p
- 20- **Anonyme, (2011)**. Rapport statistique annuelle des agrumes: frais et transformés. Ed : FAO.
- 21- **Anonyme, (2010)**. Agricultural statistics, United States department of agriculture (USDA): <http://www.usda.gov/nass/>.
- 22- **Anonyme (2014b)**. Centre national de control et certification de plants et semences (CNCC). Algérie
- 23- **Ghazli B. (2014)**. Chef du service programmation et décision du matériel végétal (institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne, ITAFV). Entretien : le 22. 10. 2014
- 24- **Affaf h et Safia Z., (2007)**. **Création et entretien d'une pépinière d'agrumes dans la région de** BLIDA. PFE **de Technicien supérieur, section arboriculture fruitière**, INSFP Ghardaia, 104p
- 25- **Djaafour M., (2006)**. Etude de comportement de la variété de Citronnier EUREKA Clône SRA 4 sur cinq porte-greffes.PFE d'Ing, Université de Blida, 88p.
- 26- **Margara J., (1989)**. Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse. ed : INRA Paris 262p.
- 27- **Auge R., Beauchesne G et Boccon-Gibod J., (1989)**. La culture *in vitro* et ses applications horticoles .ed : Tec et Doc. Lavoisier, Paris, 225p.
- 28- **Saadi A., (1991)**. Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogenèse somatique. Thèse de doctorat. Paris Grignon 162p.

- 29- **Boxus P., (1995).** Multiplication végétative: micropropagation et embryogénèse somatique en biotechnologies végétales. BV 93, ed : CNED. AUPELF- UREF 191p.
- 30- **Zryd JP., (1988).** Culture de cellules, tissus et organes végétaux .ed : Press Polytechniques. Romandes. Suisse. 308p
- 31- **Toute Y., (1998) :** Génie génétique et biotechnologie, concepts et méthodes. Candidatures à l'agronomie et aux bio-industries. ed : DUNOD. 209 p.
- 32- **Marchoux G., Gognalons P et Sélassié KG., (2008).** Virus des solanacées : Du génome viral à la protection des cultures. ed : Quae. Paris, pp 143-144.
- 33- **Semal J et Lepoivre P., (1989).** Cultures de tissus et phytopathologie : Cultures de tissus et assainissement. Laboratoire de Pathologie végétale, Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux, Belgique. pp 456
- 34- **Murashige T et Skoog F., (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Ed : Physiologia plantarum.15. pp 473-497.
- 35- **Navarro L., Roistacher C et Murashige T., (1975).** Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free *Citrus*. *J. Am .Soc. Hortic. Sci.*, 100, pp 471-479.
- 36- **Alskieff J., (1977).** Sur le greffage in vitro d'apex sur des plantules décapitées du Pêcher (*Prunus persica*, Batsch). *CR. Acad. Sci. Sér. D*, pp 2499-2502.
- 37- **Alskieff J et Villemur P., (1978).** Greffage *in vitro* d'apex sur des plantules décapitées de Pommier .CR. Acad. Sci., Sér.D, pp 1115-1118.
- 38- **Strosse H., Domergue R et Panis B., (2003).** Suspensions de cellules embryogéniques de banane. Guias tecnicas. France. INIBAP.
- 39- **Reinert J., (1958).** Morphogenese und ihren kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaften*, 45, pp 344-345.
- 40- **Steward FC., Mapes MO et Mears K., (1958).** Growth and organized development of cultured cells. II: organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45; pp 705-708
- 41- **Tisserat B ., Esane B et Murashige T., (1979).** Somatic embryogenesis in Angiosperms. *Hort. Rev.*1,pp 1-78.
- 42- **Vardi A., Frydman-shani A., Galun E., Gonem P et Belichmans S., (1990):** Citrus cybrids transfer of microcitrus organelles into-citrus cultivars.1<sup>st</sup> International symposium: *in-vitro* culture and horticultural breeding , *Acta Horticulturae* 280: pp 234-239.

- 43- **Piatti MF., (1988).** Embryogenèse somatique et synchronisation du développement embryonnaire. Thèse de doctorat d'état en pharmacie. paris VI 130p.
- 44- **Komamine A., Matsumoto M., Tsukahara M., Fujiwara A., Kawahara R., Ito M., Smith J., Nomura K et Fujimura T. (1990).** Mechanisms of somatic embryogenesis in cell culture : physiology, biochemistry and molecular biology. In: Nijkamp HJJ., Van der Plas LHW., Van aatrijk J., eds. *progres in plant celular and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp 307-313.
- 45- **Jullien M., (1991):** La multiplication végétative *in-vitro*, bases méthodologiques et physiologique. D.E.A. Ressources génétiques et Amélioration des plantes. INA Paris Grignon. 101p.
- 46- **Loiseau J., Ferriere NM et Ledeburff Y (1998).** Histology of somatic embryogenesis in pea. *Plant Physiology and Biochemistry*.36N9.
- 47- **Vasilenko AJK., Daniel MC et Conger BV., (2000) :** Ultrastructural analysis of somatic embryo initiation . Development and polarity establishment from mesophyll cells of (*Dactylis glomerata*). *In-vitro cellular and Developmental Biology plant* .V36.
- 48- **Rouget Y., (1989).** Embryogenèse somatique de la laitue *Lactuca sativum* L. Thèse doctorat d'Université d'Orsay. 147p.
- 49- **Rughla A et Jones MGK., (1998).** Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* and *S. spicatum*. *Jou.Exp Bot* 49 (320) : pp 563 - 571
- 50- **Egertsdotter U et Arnold SV., (1998).** Development of somatic embryos in Norway spruce. *Jou EXP Bot* 49 (319): pp 155 - 162.
- 51- **Norreel B. et Nitsch J.P., (1970).** Embryologie expérimentale. II. Production d'embryons à partir de tissus végétatifs. ***Bull. Soc. Bot. Fr., Mém***, 117, pp 30-39.
- 52- **Wu X., Wang J., Liu JH et Deng X., (2009),** Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange ( *Citrus sinensis* ) induced by glycerol. *Journal of Plant Physiology*, Volume 166, Issue 1, pp 52 – 62
- 53- **Morot-Gaudry JF ., (2009).** Biologie végétale, Volume 2 : croissance et développement. Dunod. 241p.
- 54- **Belanger IA., (1998).** Enjeux du développement des recherches fondamentales : qu'avons nous appris en analysant le génome *d'Arabidopsis thaliana* .*Agronomie* 6.

- 55- **Harkman V et Arnold S., (1985).** Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *picea abies* (Norway spruce). Journal plant physiology, 121: pp149 -158.
- 56- **Daikh H et Demarly Y., (1987).** Résultats préliminaires sur l'obtention d'embryons et la réalisation de semences artificielles de palmier dattier ( *Phoenix dactylifera* L). Fruit V42 (10): pp 593 - 596.
- 57- **Demarly Y et Sibi M., (1989).** Amélioration des plantes et biotechnologie In vitro variation ou variations somaclonales. Ed. John-libbey .Eurotext .London. England. 152p.
- 58- **Demarly Y., (1994).** Les biotechnologies et l'amélioration des plantes .Bull Rech.Agron. Gembloux 29.pp 5-21.
- 59- **Stanantino A., Recupero GF., Tenanova G., Caruso A., Russom P., Micalizia L et Russo G., (1998):** Ability of flying dragon Trifoliolate orange to maintain high *in-vitro* regenerative potential and polymorphisme analysis by RADR markers .fruits V(53) .pp 319-323.
- 60- **Tremblay L., Levasseur et Tremblay FM ., (1999).** Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana* , Pinaceae) and white spruce ( *P.glauca*, Pinaceae ) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability . Amer. Jour. Bot 86 (10): pp 1373 - 1381.
- 61- **Carneiro FM., (1999).** Advances in coffee biotechnology. Agbiotechnet V(1) ABN 006 CAB international.
- 62- **Redenbough K., Brian DP., James WN., Kossler ME., Viss PR et Walker K A ., (1986).** Somatic seeds encapsulation of asexual plant embryos. Biotechnology 4: pp 797 - 801.
- 63- **Fujii AA., Shade DT., Redenbough K et Walker k A., (1987):** Artificial seeds for plant propagation. Trendsin Biotechnology 5. N°12(47): pp 335-339.
- 64- **Stuart DA., Nelsen J., Mc call CM., Strickland S et Walker KA., (1985).** Physiology of the development of somatic embryos in cell cultures of alfalfa and celery . Biotechnology in science Academic press. pp 35-47.
- 65- **Ray IM et Bingham ET., (1989).** Breeding diploid alfalfa for regeneration from tissue culture. Crop Science 29(15): pp 45 - 48.

- 66- **Mamiya K et Sakamoto Y., (2001)**. A method to produce encapsulatable units for synthetic seeds in *Asparagus officinalis*. Plant Cell Tissue and Organ culture 64: pp 27 -32.
- 67- **Ferry M., Bouguedoura N et El hadrami I ., (1998)**. Patrimoine génétique et technique de propagation *in-vitro* pour le développement de la culture du palmier dattier. Numéro spécial oasis .Sécheresse. 9(2) : pp 139-146
- 68- **Rival A., Bertossi FA., Beule T., Morcillo F., Richaud F., Tregear J., Verdil JL ., Gassalin TD., Konan EK., Duval Y et Kouame B., (1998)**. Multiplication clonal du palmier à huile par embryogenèse somatique (*Elacis guinoesis jacq*). Programme de recherche lié au transfert d'échelle 10p.
- 69- **Fehér A., Pasternak T., Ötvös K., Miscolezi P et Dudits D. (2002)**. Induction of embryogenic competence in somatic cells: a review. Biologia .117P.
- 70- **Jiménez V M., (2005)**. Involvement of plants hormones and plants growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. review: CIGRAS, Université de costa Rica . 23 septembre 2005.
- 71- **Meyer S., Reeb C et Bosdeviex R., (2004)**. Botanique: Biologie et physiologie végétales, Maloine, 443 p.
- 72- **Mazliak P., (1999)**. Physiologie végétale, Croissance et développement, Ed. Hermann, 99 p.
- 73- **Heller R., Esnault R et Lance C., (1995)**. [Physiologie végétale](#) 1. Développement. 5<sup>e</sup> Ed, 2<sup>e</sup> tirage. Abrégés Masson. Paris.
- 74- **Carimi F et De Pasquale F., (2003)**. Micropropagation of Citrus. Micropropagation of woody tree and fruits. Kluwer Académie Publishers, p 840.
- 75- **D'Onghia AM., De Pasquale F., Carimi F., Savino V et Crescimanno FG (1997)**. Somatic embryogenesis from style culture as a possible means for Virus elimination in *Citrus*.J.Phytopathology .Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin. 145, pp 77-79.
- 76- **Carimi, F. (2005)**. Somatic Embryogenesis Protocol: Citrus. In: Protocol for Somatic Embryogenesis in woody Plants. Springer (eds), pp 321-343.
- 77- **Meziane M., (2005)**. Improvement of protocols for citrus psorosis virus (CPsV) elimination and in-vitro virus conservation. CIHEAM. Bari. Italy.

- 78- **Carimi F., De Pasquale et Crescimanno FG., (1995)** : Somatic embryogenesis in *Citrus* from styles culture. *Plant science*, 11, pp 81-86.
- 79- **Walali loudyi DM., (1993)** : La multiplication in vitro des espèces ligneuses In Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine Marocaine. *Biotechnol. Agron. Soc.* pp 177-182
- 80- **Tan XL et Qian YG., (1988)** : Effect of explants sources and cultural condition on plant régénération on *Gossypium gossypoides*. *Acta genét.sin.* n° 15(2), pp 473-497.
- 81- **Duran-vila N., Ortega V et Navarro L., (1989)** : Morphogenesis and tissus cultures of three citrus species. *Plant cell, Tissue. Org. Culture*, n°29, pp 123-133.
- 82- **Carimi, F. (2001)**. Somatic embryogenesis and organogenesis in Citrus for satination and *in vitro* conservation. In. Improvement of the citrus sector by the setting up of common conservation strategies for the free exchange of healthy citrus genetic resources. Option Méditerranéenne B/33, CHEAM Publication, pp 115 -128.
- 83- **Ricci AP., Mourao Filho A.A., Mendes BMJ et Piedade S.M.S. (2002)**. Somatic embryogenesis in *Citrus senensis*, *C. reticulata* and *C. Nobilis x C. deliciosa*. *Ed. Scientia Agricola*, 59(1), pp 41-46.
- 84- **Boulay, M. (1993)** : Rosier, vigne : deux exemples de transformation génétique utilisant l'embryogenèse somatique. XII<sup>e</sup> colloque I.A.P.T.C. France : l'embryogenèse somatique, approches cellulaires et moléculaires, 16-17 novembre 1993, Montpellier : pp 37-38.
- 85- **Aubert B et Vullin G., (1997)**. Pépinières et plantations d'agrumes. CIRAD, Montpellier.184p.
- 86- **Tahiri A., (2007)**. Maladies virales des agrumes, département de protection des plantes, Ed : ENA-Meknès.
- 87- **Roistacher CN., (1991)**. Graft transmissible disease of citrus. Handbook for Détection and Diagnosis. FAO (eds), Rome, 286 p.
- 88- **Frison EA et Taher MM., (1991)**. Technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm. FAO/IBPGR, Rome, Italy. 45p
- 89- **Praloran JC., (1971)**. Les agrumes, Ed: Maisonneuse et Larose. France. 565p
- 90- **Ito T., Ieki H., Ozaki K et Ito T., (2001)**. Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed citrus viroid Os. *Arch. Virol.* 146: pp 975-982.

- 91- **Bové JM., (1995).** Virus and virus-like diseases of citrus in the near east region. Ed. FAO. France. 518p
- 92- **Jain S.M. et Gupta P.K. (2005)** .Protocols of somatic embryogenesis-Woody Plants, Kluwer Aca-demics publishers.547 p
- 93- **Tremblay L., Lamhamedi M., Colas F et Beaulieu J., (2007).** Des plants aux plantations. Techniques, Technologies, Performance. Colloque de transfert des connaissances. Recueil des résumés. Centre des congrès de Québec.
- 94-**De Pasquale, F., Carimi, F., Crescimanno, F.G. (1994).** Somatic embryogenesis from styles of différent cultivars of *Citrus limon* (L). *Brum. Australian Journal of Botany*, 42, pp 587-594.
- 95- **Kuperman F.M., (1984).**Plant morphophysiology, *Moscow : Vysshaya shkola*, pp 39 –77.
- 96- **Meziane M., Boudjeniba M., Frasher D., D’Onghia AM., Carra A., Carimi F., Haddad N., Boukhalfa S et Braneci S., (2012).** Regeneration of Algerian *Citrus* germplasm by stigma/style somatic embryogenesis. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(25), pp 6666-6672.
- 97- **Rahman MH., Zaher M., Mazid M. A., Haque, M. Z. et Mahata S. C. (1996).** **Replacement of costly fish meal by silkworm pupae in diet of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.).** *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 39 : pp 64-67.
- 98-**Tautorius T E., Fowke L C et Dunstan D I., (1991),** Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.* 69 : pp 1873-1899.
- 99- **Sopory SK et Munshi, M., (1996).** Anther culture. In: Jain, S.M., Sopory, S.K., Veilleux, R.E. (Eds.), *In vitro Haploid Production in Higher Plants*, vol. I. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 145–176.
- 100- **Carimi F., De Pasquale F., Crescimanno FG (1999).** Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. *Plant Cell Rep* 18: pp 935–940
- 101- **Nanda RM et Rout GR (2003).** In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 73: pp 131–135
- 102- **Raemakers JM., Jacobsen E et Visser R.G.F., (1995).** Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81: pp 93-107.
- 103- **Smirnov V.A et Smirnova V.V., (1985).** Genetic determination of callus formation in tomatoes. *-Plant Genet. Breed.*, 19(2), pp 36-40.

- 104- **Chakravarty B et Goswamy B.C., (1999)**. Plantlet regeneration from long-term callus cultures of *Citrus acida* Roxb. and uniformity of regenerated plants. - *Scientia Hort.*, **82**(1-2), pp 159-169.
- 105- **Boussaidi F.Z., (1989)**. Essai d'établissement de culture de tissus organogènes a partir de vitro- plants et d'embryons zygotiques de chene pedoncule (*Quercus robur* L.) these de Doctorat. Bio. Veg. Forest. Nancy. France. 104p.
- 106- **Ananthkrishnan G., Ravikumar R., Prem Anand R., Vengadesan G et Ganapathi A., (1998)**. Induction of somatic embryogenesis from nucellus-derived callus of *Anacardium occidentale* L . Elsevier Science B.V. *Depar of Biotech, School of Life Sciences, Bharathidasan University, Tamil Nadu, India*
- 107- **Reinert J. et Bajaj Y., (1977)**. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, New York, 803 p
- 108- **Gaj MD (2004)**. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul* 43: pp 27–47
- 109- **Grosser JW et Gmitter FG Jr., (1990)**. protoplast fusion in Citrus improvement. *Plant Breed. Rev.* 8: pp 339-374.
- 110- **Jayanthi M et Mandal P.K., (2001)**. Plant regeneration through somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plants in *Tylophora indica*. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 37, pp 576-580.
- 111- **Yamada T., Nakagawa H. et Sinoto Y., (1967)**. Studies on the différenciation in cultured cells. I. Embryogenesis in three strains of *Solanum* callus. *Bot. Mag. Tokyo*, 80, pp 68-74.
- 112- **Buvat R., (1965)**. Recheches sur la dédifférenciation des cellules végétales .*Ann.Sci.Nat. Bot.*, 11<sup>ème</sup> série , 5 ; 228p.
- 113- **El yacoubi H., Zidane L., Douira A et Rochdi A., (2010)**. effets de deux phytohormones et de l'hydrolysate de caséine sur la callogenèse de trois porte-greffes d'agrumes. Laboratoire 'Botanique, Biotechnologie & PhytoProtection', Faculté des Sciences, Université Ibn Tofaïl, BP 133, 14000 Kénitra, Maroc.
- 114- **Oukara FZ., (2007)**. micro-propagation du pistachier de l'atlas (*Pistacia atlantica* Desf), par l'embryogenese somatique et étude du caryotype.thèse de magister. Département d'Agronomie, Université de Blida.



- 115- **Raman H., Gosal SS et Brar D.S., (1992).** Plant regeneration from callus cultures of *Citrus limon* and *C. jambhiri*. - *Crop. Impr.*, 19(2), pp 100-103.
- 116- **Vasil IK et Thorpe TA., (1994).** Plant cell and tissue culture, Kluwer Academic Publishers. pp 539-560
- 117- **Bourgkard F et Favre J.M., (1991).** Essai d'induction de l'embryogénèse somatique immatures. Biotechnologie appliquée aux arbres forestiers. Complément des annales. A Focel. Edi. Paris, pp 25-46.
- 118- **Fki L., Bahloul M., Masmoudi R et Drira N., (2001).** Etude des capacités germinatives des embryons somatiques chez le palmier dattier. Colloque et séminaires des modèles biologiques à l'amélioration des plantes IRD Edition Paris. Institut de recherche pour le développement. pp 255-269.
- 119- **Thomas E., Hoffmann F., Potrykos I et Wenzel G., (1976).** Protoplast regeneration and stem embryogenesis of haploid androgenetic rape. *Mol. Gen. Genet.*, 145, pp 245-247.
- 120- **Halperin W., (1967).** *Population density effects in embryogenesis in carrot cell cultures.* Exp. Cell. Res., 48, pp 170-173
- 121- **Lakshmanan P et Taji A., (2000).** Somatic embryogenesis in leguminous plants. Plant Biol. 2: pp 136-148.