

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université de Saida Dr. Moulay Tahar

Faculté des sciences

Département de Biologie



Mémoire de fin d'études Pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie
végétale

La Micro propagation in vitro des citruses

Préparé par : KHALIFATI Fatima zohra

TAHRI Yamina

<u>Qualité</u>	<u>Nom et Prénoms</u>	<u>Grade</u>	<u>Etb d'origine</u>
Président	Pr. HACHEM Kadda	Professeur	Univ. de Saida
Examineur	Dr. BENABDESSLEM Yasmina	Maitre de conférences « B »	Univ. de Saida
Rapporteur	Dr. CHIKHI Amira	Maitre de conférences « B »	Univ. de Saida

Année Universitaire : 2020 /2021



Remerciements

Avant tout nous remercions « Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force afin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Mlle CHIKHI d'avoir bien voulu accepter d'être notre encadreur, de nous avoir aidé et dirigé pour la réalisation de ce Mémoire ainsi pour la bienveillance dont elle a su faire preuve, par son dévouement et sa patience.

Nous remercions chaleureusement Mr HACHEM Kadda pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider ce jury et Mme BENABDESSLEM Yasmina pour l'honneur dont elle a fait preuve en acceptant de bien vouloir juger ce travail. Nous ne les remercierons jamais assez pour leur aide précieuse, leur soutien moral et leur disponibilité à tout moment. Nous souhaitons qu'ils puissent trouver ici le témoignage de notre très vive et très respectueuse reconnaissance et de notre sincère gratitude.

Nos remerciements les plus sincères reviennent à nos parents, que dieu les protègent et que la réussite soit toujours à notre portée pour que nous puissions leur combler de bonheur.

Nous tenions à remercier de tout notre cœur l'ensemble des professeurs pour leur patience, conseils et leurs précieux cours qui ont enrichi nos connaissances et de nous ont guidé durant toutes ces années.

Merci de nous avoir montré les clés du succès : avoir confiance en soi et toujours tenter de se dépasser.

A vous grand Merci.

TAHRI Yamina

KHALIFATI fatima zohra



Dédicace :

Je dédie ce travail :

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.

Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A vous mes sœurs **Mokhtaria** et **Aïcha**, et frères **Mohamed**, **Zoubir** et **Abd Alrahman** qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A mon très cher binôme, **Fatima** et à toute sa famille.

A tous mes amis, en particulier **Jihad**, **Lamia** et **Nour El houda**.

TAHRI YAMINA

Dédicace :

Je dédie ce travail :

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager.

Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A toi ma grande mère, ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir. Tu me manque, que dieu te bénisse.

A vous mes sœurs **Hafida** et **Chaima**, et frères **Bouziane**, **Abdellatif**, **Sid Ahmed** et **Cherif** qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

A mon très cher binôme, **Amina** et à toute sa famille.

A tous mes amis, en particulier **Jihad** et **Nour El houda**.

KHALIFATI Fatima Zohra

Résumé :

Les Citrus, les plus grandes cultures fruitières produites dans le monde, sont généralement multipliées de manière asexuée par bouturage ou greffage sur des porte-greffes de semis. La culture tissulaire et la micropropagation, en particulier, sont des alternatives intéressantes à la multiplication traditionnelle pour obtenir un nombre élevé de plantes conformes et saines en peu de temps et dans un espace réduit. De plus, la propagation *in vitro* fournit un système rapide pour multiplier la descendance obtenue par les programmes de sélection, permet l'utilisation de génotypes monoembryonnaires et sans pépins comme porte-greffes. Ces techniques de culture *in vitro* ont facilité l'amélioration des agrumes contre différents stress abiotiques. Elles sont permissives de remède au faible rendement et la conservation d'importants génotypes d'agrumes tout en exploitant les variations somaclonales. Ainsi à l'optimisation de la conservation, la transformation de cultivars à haut rendement.

Dans ce mémoire, différentes techniques concernant l'organogenèse, microgreffage, fusion de protoplastes, l'embryogenèse somatique, haplo méthode et de la transformation génétique ont été décrites.

Mots clés :

Micropropagation, greffage, microgreffage, protoplastes, embryogenèse somatique, porte-greffes, cultivars.

Abstract:

Citrus, the largest fruit crops produced in the world, are usually propagated sexually by cuttings or grafting onto seedling root stocks. Tissue culture and micropropagation, in particular, are attractive alternatives to traditional propagation for obtaining large numbers of uniform, healthy plants in a short time and in a small space. In addition, in vitro propagation provides a rapid system to multiply the progeny obtained by breeding programs, allows the use of monoembryonic and seedless genotypes as rootstocks. These in vitro culture techniques have facilitated the improvement of citrus against different abiotic stresses, low yields and conservation of important citrus genotypes by exploiting somaclonal variations, transformation of high yielding cultivars.

In this thesis, different techniques concerning organogenesis, micrografting, protoplast fusion, somatic embryogenesis and genetic transformation have been described.

Key words:

Micropropagation, grafting, micrografting, protoplasts, somatic embryogenesis, rootstocks, cultivars.

ملخص

الحمضيات، أكبر محاصيل الفاكهة التي يتم إنتاجها في العالم، عادة ما يتم تكاثرها جنسياً عن طريق التطعيم على جذوع تعتبر زراعة الأنسجة والإكثار الدقيق، على وجه الخصوص، بدائل جذابة للتكاثر التقليدي للحصول على أعداد كبيرة ; الشتلات من النباتات الصحية الموحدة في وقت قصير وفي مساحة صغيرة. بالإضافة إلى ذلك، يوفر التكاثر في المختبر نظاماً سريعاً لمضاعفة السلالة التي تم الحصول عليها عن طريق برامج التربية، ويسمح باستخدام الأنماط الجينية أحادية الجنين و عديمة البذور كأصول جذرية.

لقد سهلت تقنيات الاستزراع في المختبر تحسين الحمضيات ضد الضغوط اللاحيائية المختلفة، والحقول المنخفضة، والحفاظ على الطرز الوراثية الهامة للحمضيات من خلال استغلال الاختلافات النسيلية الجسدية، وتحويل الأصناف عالية الإنتاجية. في هذه الأطروحة، تم وصف تقنيات مختلفة تتعلق بتكوين الأعضاء، والتطعيم الدقيق، واندماج البروتوبلاست، والتكوين الجيني الجسدي، والتحول الجيني.

كلمات المفتاحية

التكاثر الدقيق ، التطعيم، التطعيم الدقيق، البروتوبلاست، تكوين الجنين الجسدي، روتستوك، اصناف.

Abréviation :

FAO : organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

EGFP : protéine fluorescente verte.

PEG : poly (éthylène glycol).

°C : Degré Celsius.

% : Pourcent.

Mm : millimètre.

sp : spunta.

UV : Ultra-violet.

ARNi : Acide ribonucléique interférence.

ADN : Acide désoxyribonucléiques.

Listes des figures :

PL:01 les caractères remarquables de genre citrus.....	3
Figure 01 : une coupe transversale de fruit de <i>citrus sinensis</i>	5
Figure 02 : les caractères botaniques de genre citrus.....	6
Figure 03 : la diffusion des agrumes dans le monde.....	10
Figure 04 : Diagramme present la production mondial de citrus.....	11
Figure 05 : Les différentes zones qui produisent les agrumes et leur répartition	13
Figure 06 : Technique de greffage	16
Figure 07 : la polyembryonie.....	19
Figure 08 : la micro-propagation.....	20
Figure 09 : le micro-greffage.....	22
Figure 10 : la culture de protoplaste et hybridation somatique.....	25
Figure 11 : l'embryogénèse somatique.....	26

Sommaire

I. Introduction : _____ 1

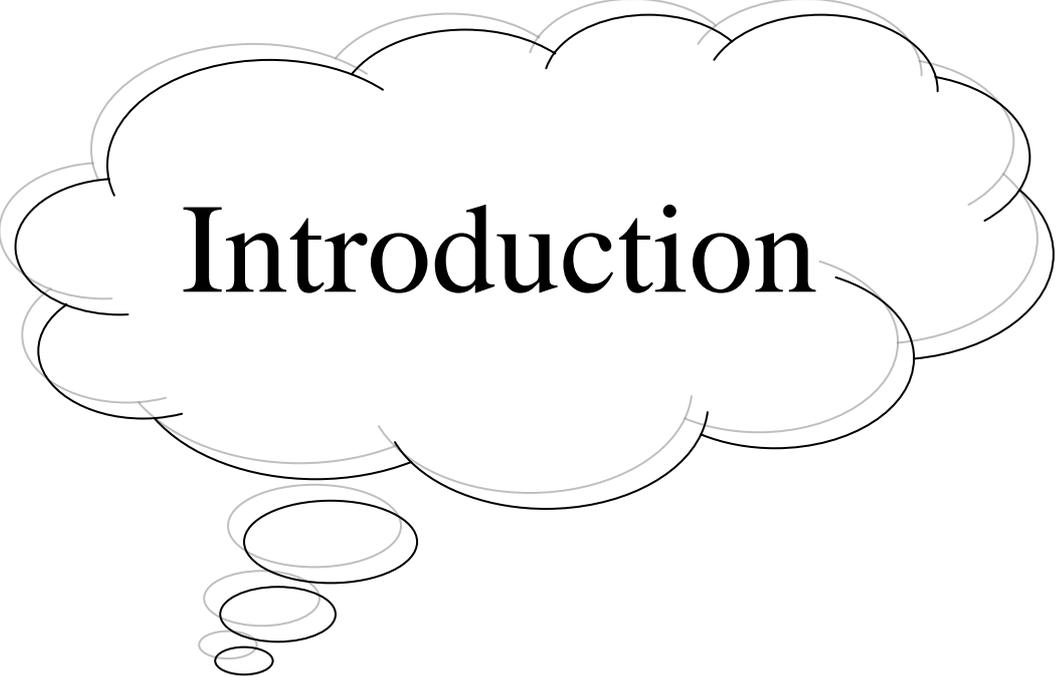
Chapitre I

1. Généralités sur les citrus :	2
2. Caractères taxonomique et morphologique du genre citrus :	2
2.1. Taxonomie :	2
2.2. Les caractères remarquable du genre citrus :	3
2.3. Caractères botaniques du genre citrus :	4
2.3.1. La croissance végétative :	6
2.3.1.1. Le développement floral :	7
2.3.1.2 Le développement du fruit :	7
3. Exigences écologiques :	7
3.1. Exigences édaphiques :	7
3.2. Exigences climatiques :	8
4. Origine géographique et dispersion des agrumes :	9
4.1. Origine géographique :	9
4.2. La diffusion des agrumes dans le monde :	9
5. Importance économique de citrus :	10
5.1. Intérêt des citrus :	10
5.2. Production mondiale :	10
5.3. La culture d'agrumes en Algérie :	12
6. Utilisation des coproduits des agrumes :	13

Chapitre II

1. Les méthodes de multiplication des citrus :	15
1.1. La reproduction sexuée :	15
1.2. La multiplication végétative :	15
2. Le Greffage :	16
2.1. La multiplication des porte-greffes :	16
2.2. L'obtention de greffe :	17
2.3. Le greffage :	17
2.4. Objectifs d'amélioration des porte-greffes	17
3. Polyembryonie	18
4. La micropropagation des arbres fruitiers :	19
5. Les modalités de régénération in vitro des citrus :	21
5.1. Micro greffage d'apex et assainissement des plants d'agrumes :	21
5.2. Culture de protoplaste et hybridation somatique :	23
5.2.1. Le transfère des gènes par les protoplastes :	24
5.3. Embryogenèse somatique :	26

5.4. Les haplométhodes :	26
5.4.1 L'obtention d'haploïdes par gynogenèse induite et androgenèse in vitro :	26
6. Transformation génétique des agrumes :	27
Chapitre III	
1. Avantages et inconvénients de la multiplication végétative <i>in vitro</i> :	28
1.1. Les avantages :	28
1.2. Les inconvénients:	29
Conclusion	31
Références bibliographiques :	32



Introduction

I. Introduction :

Les agrumes sont l'une des cultures fruitières commerciales et nutritionnelles les plus importantes au monde, il doit donc être amélioré pour répondre aux divers besoins des consommateurs et des sélectionneurs.

Le bassin méditerranéen est considéré comme la seconde zone de diversification des agrumes et a constitué un tremplin pour l'expansion des espèces agrumicoles cultivées à travers le monde. Ainsi, les pays méditerranéens sont des sources riches en germoplasmes ayant un potentiel considérable pour le développement de variétés nouvelles.

Malheureusement, en dépit de son essor, l'agrumiculture affronte une combinaison complexe de contraintes biotiques, principalement le virus de la tristeza (CTV) et *Phytophthora*, et de stress abiotiques (manque d'eau, salinité, alcalinité).

Les stratégies de production et de multiplication des cultivars d'agrumes reposent sur l'utilisation de méthodes culturales classiques qui exploitent le processus de multiplication végétative, comme le bouturage, le greffage et le marcottage. Par ces techniques, ils reproduisent des individus génétiquement identiques à la plante mère, créant ainsi des populations homogènes. Les graines, issues de la fécondation, sont aussi très utilisées pour la production de plants dans les programmes de reboisement. Il est préférable de l'appliquer comparativement à la propagation par voie sexuée car les caractéristiques génétiques des plantes sont mieux conservées. En effet, les plantations établies avec des graines conduisent à une hétérogénéité considérable de la descendance. Depuis quelques décennies, l'introduction des techniques de multiplication végétative *in vitro* ou *in vitro* méthodes a bouleversé complètement la production végétale. Ces techniques offrent de vastes possibilités pour les études fondamentales et appliquées à la micro-propagation d'espèces économiquement importantes comme les citrus. La biotechnologie joue un rôle de plus en plus important dans l'amélioration génétique des agrumes, en dont la transformation génétique s'est avérée être une puissante stratégie d'amélioration du cultivar tout en maintenant son intégrité en ajoutant un seul nouveau trait.

Ce mémoire résume les progrès réalisés jusqu'à présent dans les techniques nouvelles de la micro-propagation et biotechnologie des agrumes.

Ce mémoire se divise en trois chapitres. Le chapitre I concerne les généralités sur les citrus. Le chapitre II est consacré à la micro-propagation des citrus. La dernière partie de cette thèse (Chapitre III) s'est proposé pour les avantages et les inconvénients de la micro-propagation des citrus.



Chapitre I

1. Généralités sur les citrus :

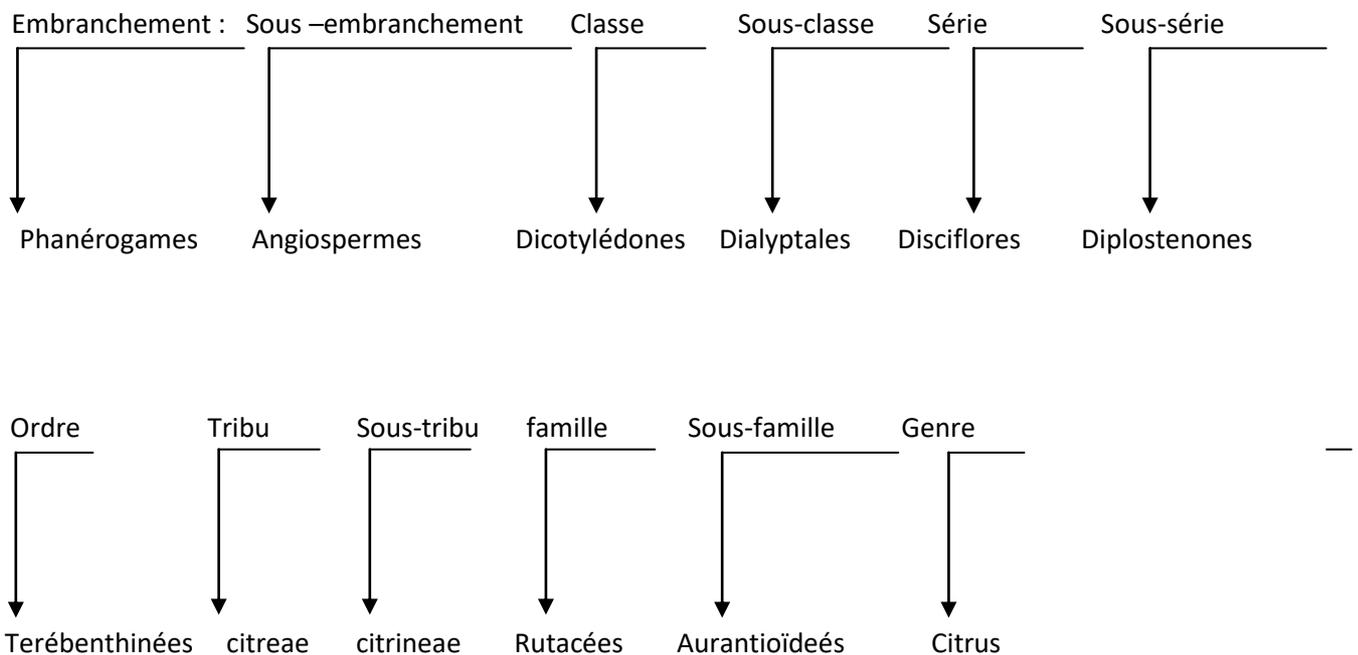
Le genre Citrus est cultivé dans plus de 100 pays, ce qui en fait l'une des cultures fruitières commerciales les plus importantes en termes de valeur économique et de nutrition humaine. Les fruits frais et le jus sont les produits les plus importants des agrumes, mais les huiles essentielles, la pectine et la marmelade, ainsi que les écorces confites et séchées, ont également une valeur commerciale (**Barlass et Skene, 1986**). L'aire agrumicole actuelle est elle-même très vaste.

2. Caractères taxonomique et morphologique du genre citrus :

2.1. Taxonomie :

Le genre citrus constitue, le genre le plus important, c'est au sein de ce genre que se rencontrent les principales espèces cultivées. Deux grandes classifications existent pour les citrus. Celle de Tanaka (1961) comprend 156 espèces tandis que Swingle et Reece (1967) n'en distinguent que 16, cette contradiction s'explique par les larges possibilités d'hybridation interspécifique.

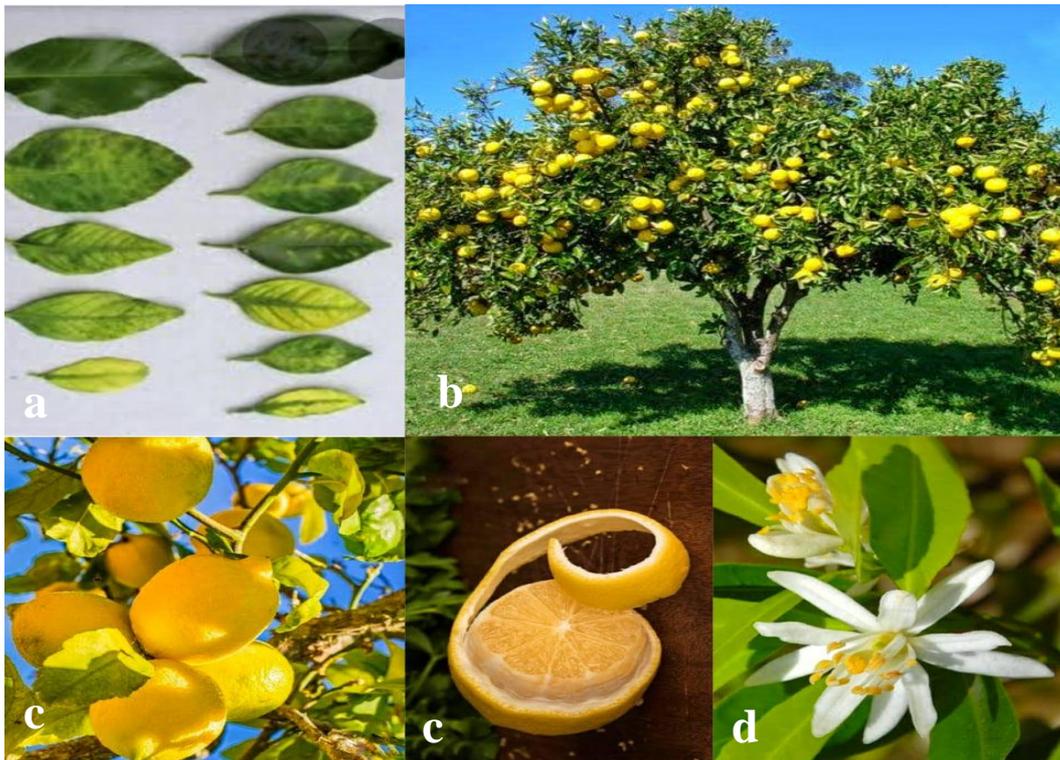
Le genre citrus appartient à la systématique suivante d'après **Swingle** :



2.2. Les caractères remarquables du genre citrus :

Swingle décrit les caractères distinctifs généraux du genre citrus de la manière suivante :

- petit arbre dont les jeunes rameaux deviennent très rapidement cylindrique, épineux (épine simple à l'aisselle des feuilles) mais dans les branches sont fréquemment internes.
- Feuille à une foliole, habituellement minces, non coriaces, dont les nervures principales sont peu nombreuses, le réseau de nervures secondaires ne ressort pas sur le limbe .
- Le pétiole, en générale, plus ou moins ailé et articulé avec le limbe (sauf dans le genre *Citrus medica* à une pétiole non ailé ou simplement marginé et non articulé avec le limbe).
- Les fleurs apparaissent à l'aisselle des feuilles, elles sont solitaires ou en petites groupes corymbiformes.
- Le fruit est formé de segments contenant les graines placées dans l'angle inférieur, le reste de l'espace est rempli de poils vésiculaires. (Swingle et Reece , 1967). (PL01)



PL01 : les caractères remarquables de genre citrus.

(a: feuilles; b: arbre; c: fruit; d: fleurs)

2.3. Caractères botaniques du genre citrus :

Le système aérien des citrus est constitué du tronc, c'est au niveau du tronc que se situe la ligne de greffe résultant de l'association de la variété et du porte-greffe.

Les branches charpentières constituent l'armature de l'arbre limités de 3, 4,5 par la taille de formation, les charpentières se divisent en sous charpentières (ou sous mère) qui à leur tour porteront les rameaux végétatifs et les rameaux fructifères.

Les feuilles des citrus sont persistantes, présentent une grande variabilité de forme et de taille non seulement entre les espèces et les variétés, mais également suivant, leur âge ; plus larges et plus grandes dans les jeunes arbres que les arbres adultes.

Certains citrus ont des feuilles qui portent à leur base un aileron plus ou moins développé et souvent associé à l'aisselle de la feuille, avec une épine (Bigaradier, Oranger, Pomelo) par contre d'autre espèces l'aileron est absent et l'épine développé (Citronnier, Mandarinier, et Clémentinier).

- La fleur de citrus est composé de 3 à 5 sépales colorés en vert, soudés en forme de coupe protectrice ; ils constituent le calice ; et de 4 à 8 pétales (généralement 5), blanc ou légèrement colorés en pourpre chez certaines espèce (Citronnier, Pomelos, Limettiers). Ils forment a corolle de 20 à 30 étamines, soudées à leur base par groupes de 3 à 4.

-Les fruits des citrus des principales espèces et variétés cultivées des citrus différents par leur coloration, leur forme, leur grosseur, tous les fruits de citrus cultivés présentent la même structure anatomique, on peut distinguer les parties suivantes.

- L'écorce, La partie non comestible de fruit, cette écorce est formée de l'épicarpe et le mésocarpe externe et interne. C'est l'épicarpe (ou l'épiderme) qui se colore en orangé, ou jaune, l'épicarpe et le mésocarpe externe constituent le flavédo où se trouvent localisées les glandes oléifères riches en huiles essentielles. Le mésocarpe interne constitue l'albédo de couleur blanchâtre et de texture spongieuse.

- La pulpe ; La partie comestible du fruit, elle est formée par l'endocarpe, cet endocarpe est constitué par un ensemble de poils ou vésicules renferment le jus, et qui sont regroupés en quartiers, le nombre de quartiers varie de 5 à 18 (**Figure 01**)

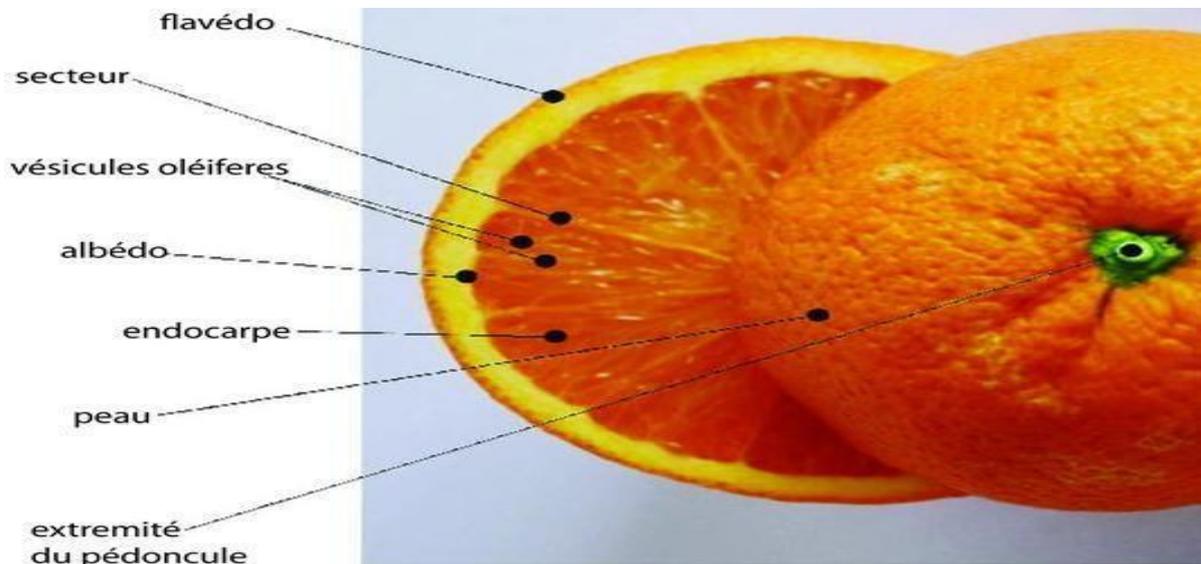


Figure 01:Coupe transversale de fruit de *citrus sinensis*. (Polese, 2008).

- Les pépins ; Ils proviennent, comme toutes les graines, de la double fécondation, d'une part du grain du pollen et d'autre part de l'ovule de l'ovaire. Le nombre de pépin est variable, en fonction de l'espèce et de variété et suivant aussi les conditions de pollinisation (**Paraloron, 1971**).(Figures 1)

Le système racinaire des agrumes est essentiellement localisé dans les premiers 10cm de profondeur, les racines principales au nombre de deux à trois se développent jusqu'à 1 à 2 mètres de profondeur, les racines secondaires se divisent en fines racines qui constituent le chevelu racinaire elles ont un rôle de maturation.

Il est couramment admis que les agrumes vivent très longtemps, mais sa longévité est de l'ordre de 30 à 35 ans, période durant laquelle des productions sont élevées, les conditions de milieu et les pratiques culturales peuvent influencer favorablement ou défavorablement sur la longévité des arbres (**Paralron,1971**).



Figure 2 : les caractères botaniques de genre citrus. (Herboristerie au temps des fées)

2.3.1. La croissance végétative :

Se manifeste sur les jeunes ramifications au cours de 3 périodes :

Au printemps : se manifeste la pousse de printemps, sur ces nouvelles ramifications apparaissent en (Avril –Mai) les pousses fructifères (boutons floraux) puis fleurs.

En été : se développe la pousse d'été, cette pousse est en générale moins importante que les pousses de printemps et d'automne.

En automne : (d'Octobre à la fin Novembre) apparaît la 3ème pousse ; elle assure en partie le renouvellement du feuillage.

2.3.1.1. Le développement floral :

Les principales étapes du développement floral sont :

° La pollinisation :

Lors de la pleine floraison, la pollinisation se fait par le vent ou par les insectes (principalement les abeilles). En période de pollinisation, si le temps est humide et frais, les insectes pollinisateurs sont peut actifs, les graines de pollen sont détériorées par l'excès d'humidité.

• La floraison :

Pour la plupart des citrus cultivés, la floraison a lieu au printemps, de la fin Mars au début Mai, au même temps que s'effectue la pousse de printemps, chez certaines espèces, les floraisons peuvent s'échelonnées durant toute l'année.

2.3.1.2 Le développement du fruit :

• La nouaison :

La nouaison constitue le stade qui suit la fécondation (si elle a eu lieu) ou en absence de fécondation complète (développement parthénocarpique).

• La Maturation :

Le grossissement du fruit est rapide (Mai, Juin). Les principaux facteurs influent sur ce grossissement : l'âge et la vigueur de l'arbre et les conditions climatiques (L'excès de chaleur, insuffisance d'eau ...etc.). Au cours du mois d'été (Juillet –Août, Septembre) le fruit poursuit son développement en grosseur pour atteindre en Octobre son calibre définitif.

Pour certaines espèces, le grossissement du fruit est plus étalé dans le temps et peut se poursuivre en hiver et au printemps.

3. Exigences écologiques :

3.1.Exigences édaphiques :

En dehors des exigences particulière de certains porte-greffes, les qualités physiques d'un bon sol agrumicole sont analogues à celles requises pour l'installation d'un verger quelle que soit l'espèce considérée ; les meilleures terres sont les terres de texture moyenne, c'est à dire celles où les éléments fins (argile + limon) se trouve en proportions égales aux éléments moyens (sables moyens et grossiers) (**Gddefroy, 1971**).

Les critères à prendre en compte pour juger de ces qualités sont :

- La profondeur et l'homogénéité du sol
- Sa perméabilité et sa porosité
- Sa capacité de rétention pour l'eau.

3.2.Exigences climatiques :

Température :

Au cours des siècles de culture, les agrumes sont originaires de pays du Sud-est asiatique et donc soumis au climat chaud et humide des moussons se sont adapté au climat plus sec et plus frais de leurs aires d'extension.

Les agrumes sont des végétaux assez fructifères, ce sont les conditions de température qui limitent leur aire géographique commerciale entre les parallèles 40°Nord et Sud, leurs cultures commerciales se trouvent en majeure partie sous les climats subtropicaux voisins des mères **(Paraloron, 1971)**

La température moyenne favorable à la culture des citrus est de l'ordre de

- 10° à 12° c pour la moyenne hivernale
- 22° à 24° c pour la moyenne estivale.

Les agrumes subissent deux périodes de dormance :

- 1- Une dormance d'été qui se produit en jours long et chauds
- 2- Une dormance d'hiver survenant en jour courts et froid.

Une humidité atmosphérique pendant la saison chaude peut provoquer des attaques de phytophthora.

Les racines commencent à végéter que lorsque la température du sol atteint +12° c.

La pluviométrie :

Les agrumes étaient originaires d'une région où la pluviométrie atteint et dépasse même 1200 mm par an, cette pluviométrie globale annuelle, représente une quantité d'eau au-dessus de laquelle la culture d'agrumes exige le recours à l'irrigation.

4. Origine géographique et dispersion des agrumes :

4.1. Origine géographique :

L'origine géographique exacte des agrumes n'est pas clairement identifiée, bien que la plupart des chercheurs la situe dans le Sud-est asiatique, au moins 4000 ans avant Jésus-Christ.

Il existe plusieurs légendes relatives à l'origine des agrumes. Selon Tanaka (1954), le principal centre d'origine se situerait sous une ligne allant du Nord-est de l'Inde au Nord de la Birmanie et au Sud de l'île de Hainan. A partir de cette zone, la dispersion se serait effectuée vers l'Est de l'Inde, l'archipel Malais et la Chine du Sud.

4.2. La diffusion des agrumes dans le monde :

La diffusion des agrumes à travers le monde s'est faite très lentement. Ils ont été tout d'abord importés en Afrique du Nord, puis probablement sous l'effet de la chute de l'empire Romain sont arrivés dans le Sud de l'Europe où ils ont prospéré pendant le moyen âge, le Cédraier (*Citrus medica*) fut probablement le premier agrume cultivé en Europe (300 ans avant J.-C. d'après (Webber, 1967).

En 1992, Gallais et Banneot mentionnent que la Bigaradier (*Citrus aurantium*), le citronnier (*Citrus limon*) et l'oranger (*Citrus sinensis*) ont été introduit dans le bassin méditerranéen que vers la moitié du XII^e siècle). Quant à la clémentine, c'est un hybride découvert en 1903 à Misserghine près d'Oran par le père Clément Rodier dans le cadre de son activité habituelle. La diffusion vers le continent américain est postérieure au second voyage de Christophe Colomb, le pomélo (*Citrus paradisi*) originaire de la zone antillaise, est sans doute issu de l'hybridation spontanée entre les agrumes introduites dans la région (Loussert, 1989).

L'étendue de l'aire agrumicole actuelle est également très vaste se situant approximativement entre les 40° de latitude Nord et 40° de latitude Sud, tout autour du monde. Les agrumes donc présentent donc une grande capacité d'adaptation à des conditions pédo-climatiques très différentes. La superficie plantée en agrume est évaluée à plus de 3 millions d'hectares (Figure 03) (Gallais et Banneot, 1993).

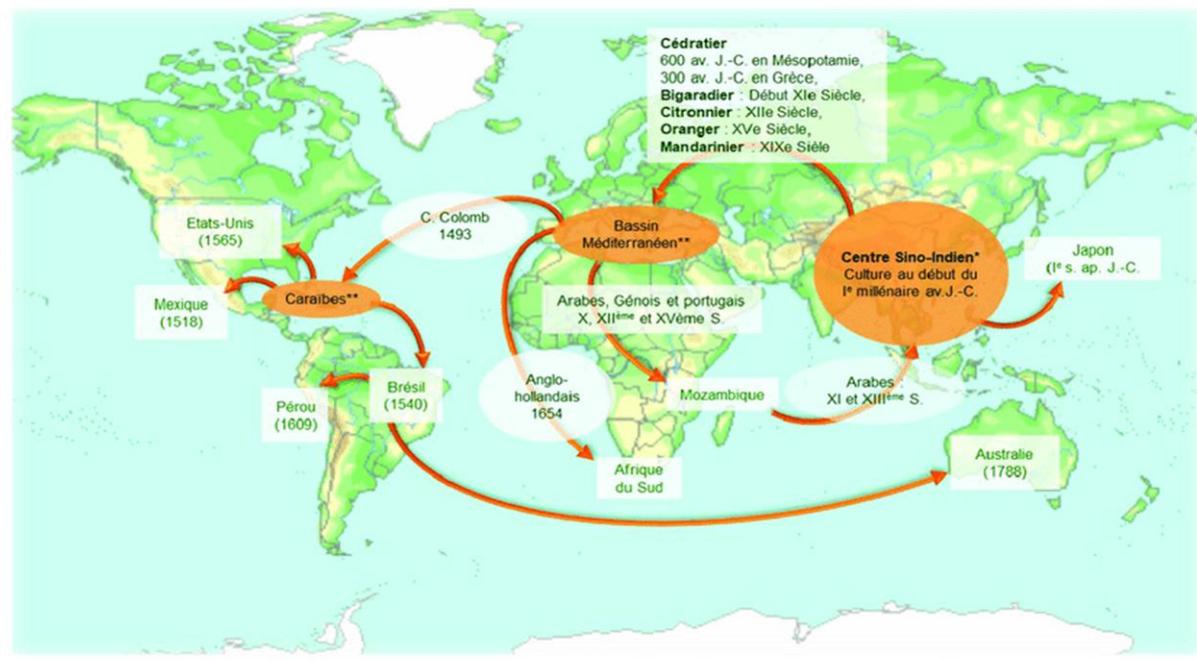


Figure 03 : la diffusion des agrumes dans le monde. (ATLAS of fruits history).

5. Importance économique de citrus :

5.1. Intérêt des citrus :

L'importance de l'agrumiculture au niveau de l'économie agricole mondiale est démontrée par la production considérable et la superficie totale plantée qui évaluée à plus de 3 millions d'hectares (Rousse, 1988) répartie sur une aire très large située approximativement entre les 40° de l'attitude Nord et Sud autour du monde. Les agrumes présentent une grande d'adaptation à des conditions pédoclimatiques très différentes (Gallais et Banneot, 1992).

5.2. Production mondiale :

La production mondiale d'agrumes, toutes espèces confondues, s'élève à plus de 110 millions de tonnes par an, sur une superficie de 7,5 millions d'hectares environ. Les oranges représentent environ 60 % de la production totale d'agrumes. Les tangerines, mandarines, clémentines et satsumas comptent pour 23 % du volume mondial. Environ 13,7 millions de tonnes de citrons et de limes, ainsi que 4,4 millions de tonnes de pamplemousses et pomelos sont produites annuellement.

Les rendements moyens se situent entre 5,3 et 6,7 tonnes/an, mais les pays aux cultures plus intensives atteignent une moyenne nationale de 11 à 15,5 tonnes/an. Dans les régions les plus propices, les meilleurs producteurs parviennent à produire 20 à 26 tonnes/an. Le Brésil cultive un quart de la production mondiale d'agrumes dont 75 % sont transformés en jus. La Chine et les États-Unis sont également d'importants producteurs avec respectivement 17,6 et 11 millions de tonnes.

Ensemble, le Brésil et les États-Unis représentent plus de 90 % de la production mondiale de jus d'orange. Environ 22 millions de tonnes d'agrumes sont produits dans la région méditerranéenne, principalement pour la consommation de fruits frais. L'Espagne, l'Italie, l'Égypte, la Turquie et la Grèce sont les principaux producteurs (**Figure 04**).

Plus de 90 % de la production mondiale d'agrumes frais sont consommés dans le pays d'origine. La région méditerranéenne est le plus grand exportateur de fruits frais. Les principaux importateurs sont l'Allemagne, la France, les Pays-Bas et le Royaume-Uni.(**Froelicher,2010**)

Orange acreage ('000 acres)

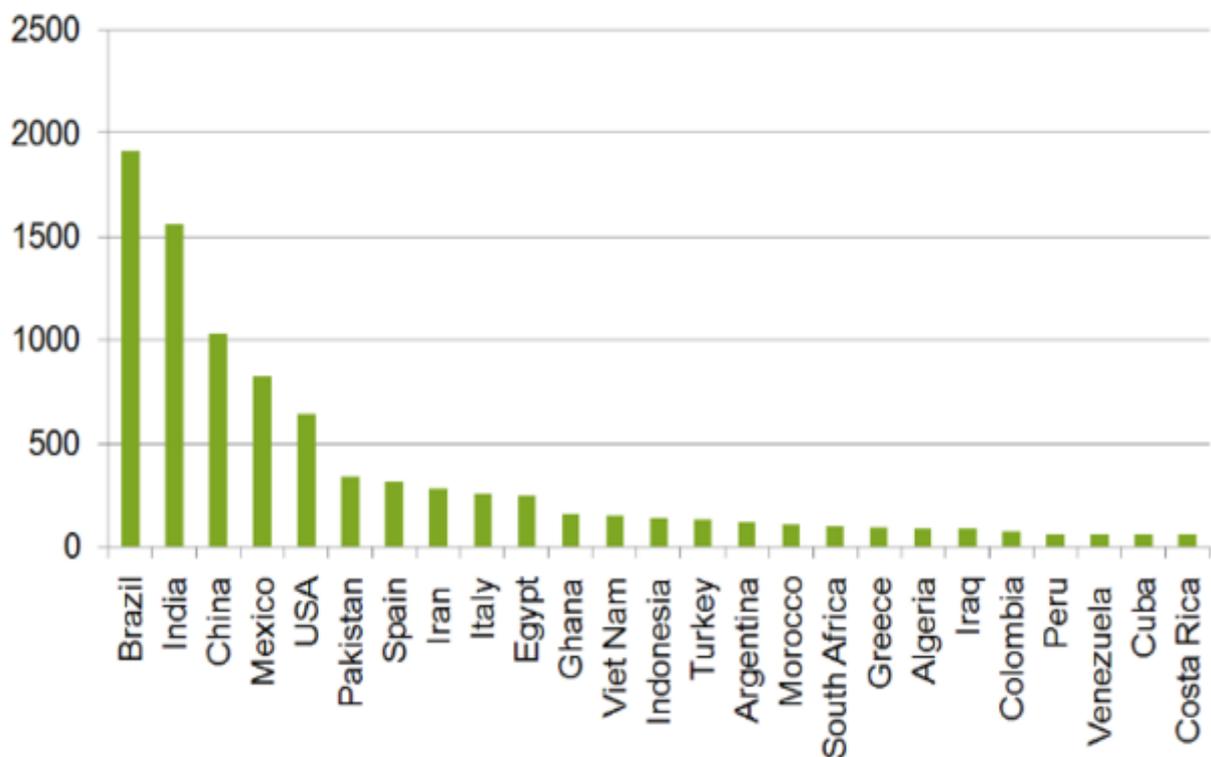


Figure 04 :diagramme présent la production mondial de citrus.

5.3.La culture d'agrumes en Algérie :

La culture des agrumes est délicate, car elle exige une température moyenne élevée et des sols frais ou facilement irrigables, mais s'accommode mal du voisinage immédiat de la mer. C'est donc dans les vallées abritées et dans les plaines de la dépression sublittoral, où le sol est humide, ou qui présentent des possibilités d'irrigation, que nous rencontrerons les principales plantations : les plaines d'Oran, du Sig et de l'Habra, la vallée de la Mina, dans le département d'Oran, la plaine du Chélif aux environs d'Orléans ville, et la Mitidja dans le département d'Alger, les plaines de Bône et de Philippe ville dans le département de Constantine (**Figure 05**)

Nous distinguons :

° De l'est à l'ouest :

° La plaine de la Mitidja : 43%

° Le périmètre de la Mina et Bas- Chélif : 27%

° Le périmètre de Bounamoussa (Annaba) et la plaine Saf-Saf (Skikda) : 10%

° Le périmètre de la Habra (Mascara) : 07% (anonyme, 2010)

° Les Wilaya les plus potentielles sont Blida (27%) Chlef (11%) Mascara (8%), Mostaganem et Skikda (5%)

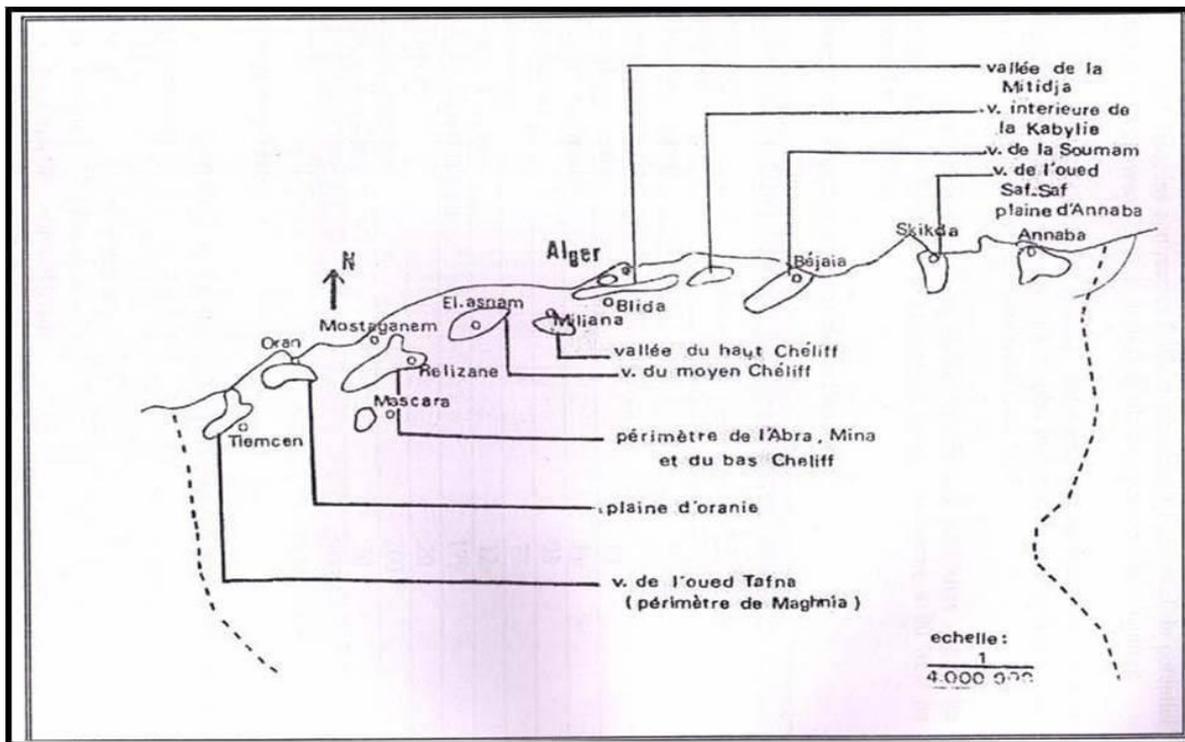


Figure 05: les différentes zones qui produisent les agrumes et leur répartition.

(A l'est ces zones se répartissent à Annaba, Béjaia et Skikda. A l'ouest on les trouve à Mascara, Mostaghanem, Oran, Relizane et Tiemcen. Au centre on trouve les zones à Alger, Blida, El-asnam et Miliana).

6. Utilisation des coproduits des agrumes :

Les agrumes sont soit consommés comme fruit, soit utilisés dans la fabrication de produits dérivés ou de coproduits, environ le tiers de la production totale d'agrumes est destiné à être transformé. Le produit le plus important issu de la transformation des agrumes est le jus d'orange. En outre, les agrumes peuvent être transformés afin d'obtenir d'autres produits alimentaires tels que des produits déshydratés de la marmelade ou de confitures.

Les coproduits des agrumes sont principalement :

Issus du pillage des écorces d'agrumes, elles sont utilisées par l'industrie agroalimentaire afin de donner de la saveur aux boissons et aux aliments. Elles sont également l'un des importants produits de l'industrie pharmaceutique pour la préparation de médicaments et de savons, de parfums et autres cosmétiques, ainsi que pour des produits d'entretien à usage domestique. De part leur richesse en métabolite secondaire, les agrumes en générale, le genre citrus en particulièrement comprend un bon nombre de substance bioactive.

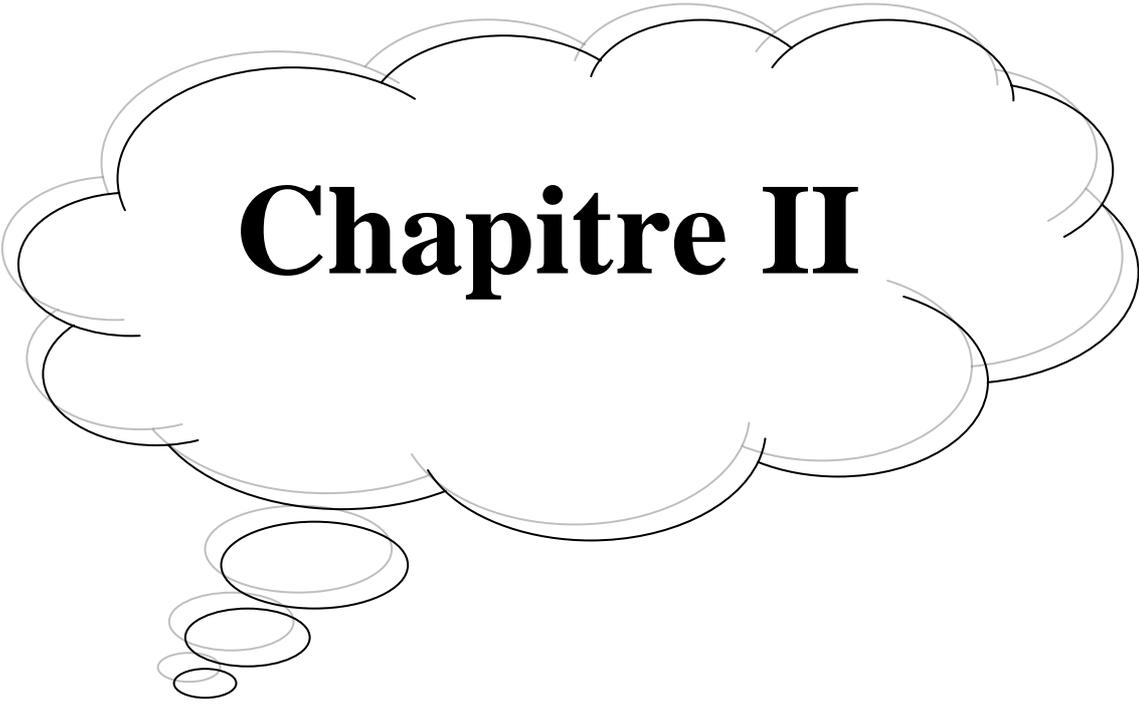
Nous citons entre autre le D-limonène : qui vient a la base de l'odeur caractéristique des agrumes.

-D- limonène :

Comme l'odeur principale qui constitue les agrumes, le D-limonène est utilisé dans l'industrie agroalimentaire ainsi que dans l'industrie pharmaceutique pour parfumer les médicaments, aliments notamment les alcaloïdes amers. Il est également utilisé dans les produits nettoyants pour son odeur rafraîchissante orange-citron et son effet dissolvant.

Ainsi, le limonène est également de plus en plus utilisé comme solvant, notamment le dégraissage des machines, puisqu'il est produit depuis une source renouvelable, l'huile de citrus, comme un sous-produit de la fabrication de jus d'orange.

Le limonène, LIM, de formule brute $C_{10}H_{16}$, est un hydrocarbure terpénique présent dans de nombreuses huiles essentielles à partir desquelles il peut être obtenu par distillation. À température ambiante, c'est un liquide incolore à odeur brillante, fraîche et propre d'orange, caractéristique des agrumes.



Chapitre II

1. Les méthodes de multiplication des citrus :

Les citrus peuvent se multiplier par deux modalités principales :

La reproduction sexuée et la multiplicatrice végétative.

1.1.La reproduction sexuée :

Dans le Sud asiatique, aire origine des agrumes, subsistent des zones de multiplication traditionnelle où les cultivars sont cultivés par semis, cette méthode de propagation a de nombreux désavantages, l'expression des caractères de juvénilité et va par ailleurs, à l'encontre de la recherche de cultivars à fruit aspermes, mais il reste cependant le moyen courant de propagation des porte-greffes. Des problèmes de conformité peuvent se poser, compte tenu du caractère partiel de l'apomixie (**Gallais et Banneot ,1992**). Les plants issus de semis seront greffés.

1.2.La multiplication végétative :

Dans les conditions commerciales, on ne multiplie plus les variétés cultivées directement, par bouturage, la gommosse, la tristeza, attaquent trop facilement les plants ainsi obtenus (**Gallais et Banneot, 1992**).

Le bouturage sous nébulisation combiné avec les traitements aux substances de croissance rhizogènes reste le plus satisfaisant des traitements, il s'applique notamment au Citrange Troyes (**Rebour, 1966**), sujet tolérant à la tristeza qui produit peu de semence, le bouturage permet d'obtenir une régularité des plants.

2. Le Greffage :

En plantation commerciale, les agrumes comme la majorité des arbres fruitiers, se présentent sous forme d'un complexe cultivar- porte-greffe (Loussert, 1971).

Cette technique comporte trois étapes :

2.1.La multiplication des porte-greffes :

La multiplication des porte-greffes est classiquement réalisée par semis de graines polyembryoniques. Le bigaradier (*Citrus aurantium*) a longtemps été le porte-greffe le plus intéressant en raison de son adaptation à de nombreux types de sol, de sa compatibilité avec la plupart des variétés, de sa tolérance à un grand nombre de viroses.

De la productivité qu'il confère aux cultivars et de sa résistance à la gommose mais il est sensible à la tristeza et on tend à le remplacer par deux porte-greffes résistants à cette virose et à la gommose : le *Poncirus trifoliata* et *Citrangue Troyer*, hybride de *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* qui est incompatible avec le citronnier (Loussert, 1992).

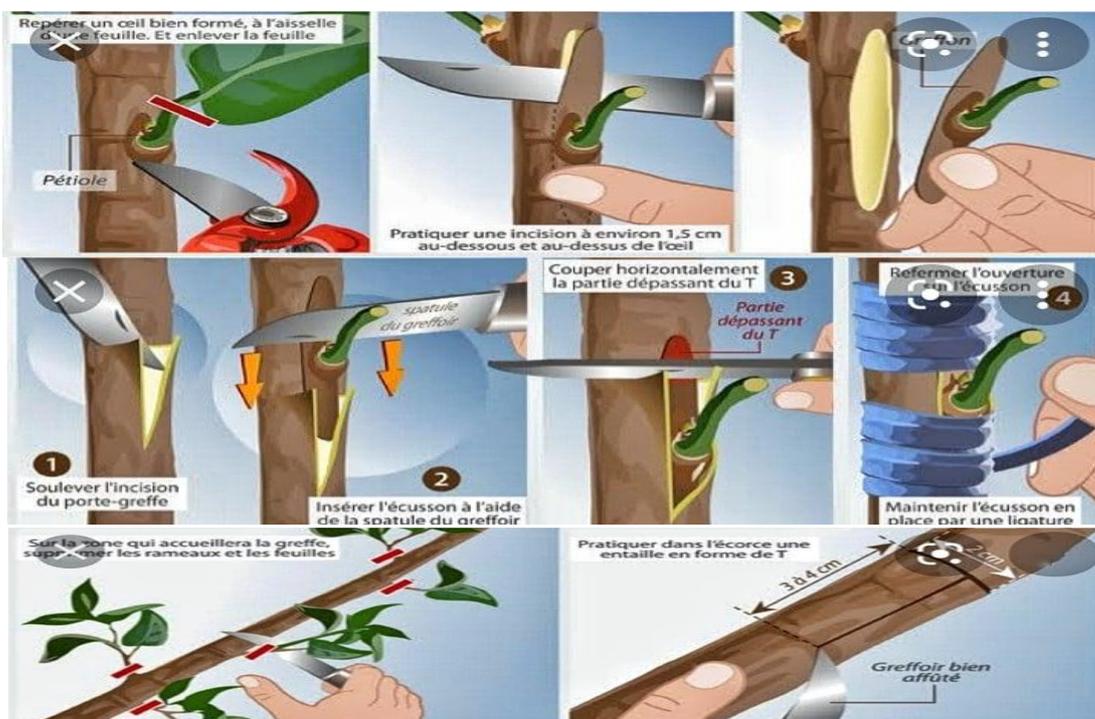


Figure 06 : Technique de greffage. (ooreka maison)

2.2.L'obtention de greffe :

Il faut relever les greffons sur des rameaux complètement lignifiés, le prélèvement s'effectue en hiver (Janvier, Février) âgés de 1 à 2 ans, doivent être indemne de maladies. Les rameaux greffons sont constitués par des baguettes de 20 à 30cm portants deux yeux bien formés (**Figure 06**).

2.3.Le greffage :

Chez Les agrumes, la majorité des porte-greffes, se présente sous forme d'un complexe cultivar- porte-greffe.

Les types de greffage utilisés, le greffage d'yeux ou par sur greffage.

- Greffe en écusson : Dite œil poussant (l'œil se développe après soudure au porte-greffe, deux à trois semaines après le greffage).

On les greffe à partir du printemps (mois de Mai) à l'œil poussant sinon, on opère le greffage de fin d'été (Août –Septembre) à l'œil dormant.

- Le sur greffage, est couramment utilisé en Espagne, permet une relation rapide et donc une meilleure adéquation avec le marché.

En Afrique du Nord, il faut trois ans pour faire un plant d'agrumes.

L'arrachage peut se réaliser en hiver ou le printemps qui suit le greffage : les plans sont dits de 8 à 12 mois de greffe.

De nombreuses maladies des agrumes étant transmissibles par greffage, il est indispensable de réaliser une sélection sanitaire ont un assainissement des pieds mères, aujourd'hui, l'assainissement est classiquement réalisé par les techniques *in vitro* (micro greffage, embryogenèse somatique...etc.).

2.4.Objectifs d'amélioration des porte-greffes

La principale fonction des porte-greffes est de faciliter l'adaptation des variétés aux différentes conditions environnementales dans les différentes zones de culture. L'utilisation de porte-greffes a été conditionnée par l'apparition de certaines maladies causant de graves pertes

économiques. Ainsi, le premier porte-greffe utilisé dans le monde le bigaradier (*Citrus aurantium* L.)

Pour sa tolérance aux *Phytophthora* sp. De plus, il est l'un des rares à tolérer aussi bien des sols calcaires que des sols acides, l'hygromorphie et dans une certaine mesure, la salinité (**Grosser et Chandler 2004**). Cependant, les bigaradiers se sont avérés particulièrement sensibles à la maladie de la tristeza, apparue au début du 20^{ième} siècle. La diffusion de la tristeza, à la quasi-totalité de l'aire de production des agrumes, entraîna la mort de près de 100 millions d'orangers et de mandariniers greffés sur bigaradier. Actuellement, un nombre limité de porte-greffes est disponible et ils doivent préalablement être testés dans les différentes conditions pédoclimatiques avant d'être cultivés.

Le travail d'amélioration des porte-greffes consiste à obtenir des génotypes résistants ou tolérants aux contraintes biotiques et abiotiques.

Les premiers critères recherchés sont une bonne adaptation aux sols alcalins ou acides, une bonne tolérance aux pathogènes du sol en particulier aux *Phytophthora* sp. et aux nématodes et une tolérance à la tristeza. De plus, le porte-greffe doit être compatible avec la variété et favoriser une forte productivité ainsi qu'une bonne qualité des fruits comme le calibre, l'épaisseur de la peau, la teneur en jus ou la saveur du fruit. Les porte-greffes entraînant une entrée rapide en production de la variété sont également recherchés.

La production de semences vigoureuses avec une polyembryonie élevée est un autre aspect souhaité par le pépiniériste, car il facilite la propagation et l'uniformité des plants et réduit les coûts de production.

D'autres critères plus spécifiques des régions peuvent être également pris en considération. Ainsi, la résistance au froid pour la Floride, le Japon ou la Géorgie, la tolérance au stress hydrique, au calcaire ou à la salinité pour certains pays du bassin méditerranéen, constituent des critères particulièrement importants. (**Froelicher, 2010**)

3. Polyembryonie

Chez de nombreux cultivars, les graines contiennent plusieurs embryons; ces embryons surnuméraires sont issus des cellules du nucelle (**Figure 07**). Seule deux espèces (*C medica* et *C grandis*) ne présentent que des cultivars monoembryonnés. Pour les autres, le degré de polyembryonie peut varier de manière importante suivant les variétés. La polyembryonie conduit à l'obtention, dans les semis, d'une proportion élevée de plantes nucellaires possédant le génotype maternel. Elle limite ainsi les effectifs des populations recombinantes analysées et donc la

probabilité d'obtenir des génotypes élités par hybridation entre cultivars polyembryonies. Cette contrainte a réduit significativement la base génétique exploitée en conduisant les améliorateurs à retenir généralement que des géniteurs femelles monoembryonnés (Soost, 1987).

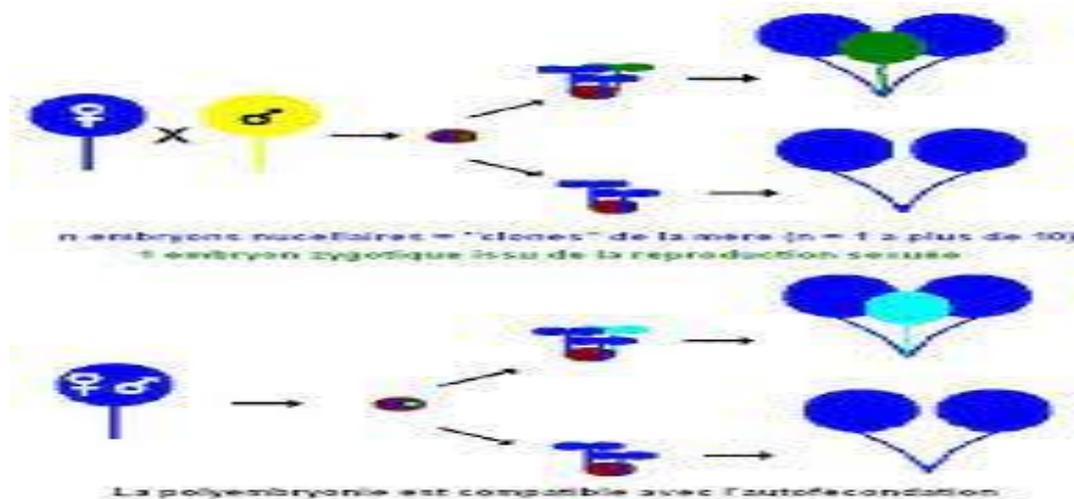


Figure 07: schéma simplifié de la polyembryonie. (pomum.fr)

4. La micropropagation des arbres fruitiers :

La multiplication in vitro des variétés : la plupart des variétés fruitières se montrent rebelles au bouturage la maîtrise de la multiplication in vitro permet d'obtenir des boutures racinées et de variétés poussant sur leur propre racines auto-enracinées (Figure 08) (Gautier,1988)

La culture in vitro est employée pour la multiplication des porte-greffes ou des variétés poussant sur leurs propres racines, les porte-greffes issus de multiplication in vitro peuvent avoir deux destinations :

- Une utilisation directe, le porte-greffe est planté et greffé en pepinière .
- Une utilisation indirecte, le porte-greffe est sert à établir une **marcottière** .

Un certain nombre de résultat positifs ont été obtenu chez les espèces fruitières :

Vigne (Galzy, 1972), pommier (Jones, 1976), pinups pinaster (David et David, 1977 ; Franclé et al., 1980 ; Rancillac, 1971 et 1981), noisetier (Alkai et al., 1984), Noyer (Priver et Kuniyuki, 1984 ; Jayallemand et al., 1988,1991,1991,1992).

Aujourd'hui, la culture in vitro des arbres fruitiers, reposent tout sur la régénération des bourgeons capables d'évoluer en plantes entières fonctionnelles ; on distingue plusieurs

modalités de régénération plus ou moins ou bien maîtrisées sur les espèces fruitières : (**Gallais et Banneot,1992**).

- le bourgeonnement adventif à partir d'explant divers (tige, limbe, foliaire, racine)

Il est bien maîtrisé sur le kiwi (*actinidia, deliciosa*), le pommier, le poirier, avec grandes différences entre des génotypes.

→ Micro greffage d'apex et l'assainissement du matériel végétal est un composant important de la gestion du germoplasme agrume.

→ Les régénérations après une phase de cal issu de l'explant ou de proloplastés 'ta encore plusieurs espèces d'agrumes présentent une bonne aptitude à la production de cals régénérant des bourgeons au des embryons.

→ L'Embryogenèse somatique directe bien maîtrisé chez plusieurs espèces d'agrumes chez le caféier et mangoier.

→ En fin, l'androgenèse et la gynogenèse in vitro pour l'obtention des plantes haploïdes, puis di haploïdes.

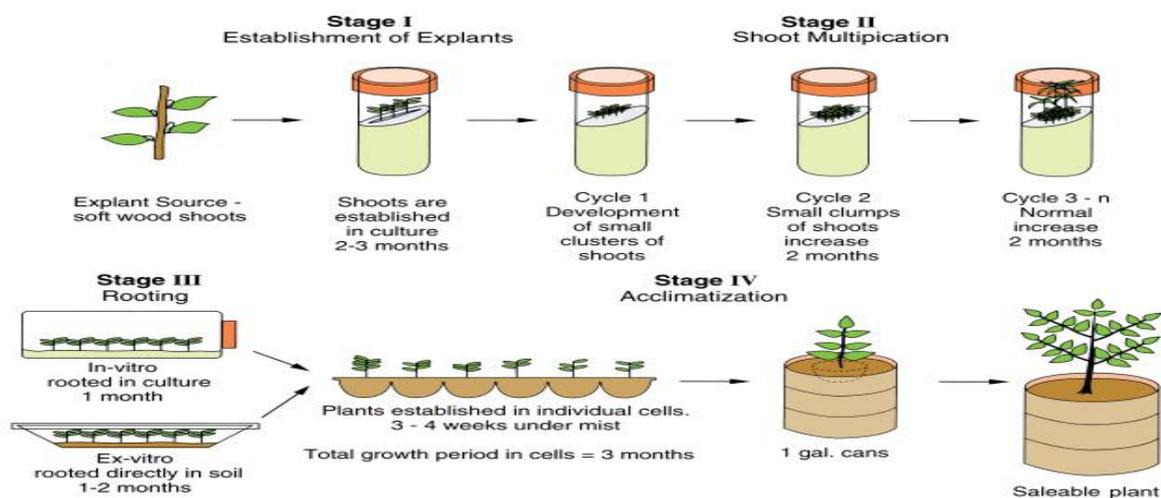


Figure 08 : schéma représente les étapes de la micro propagation. (microbe notes)

5. Les modalités de régénération in vitro des citrus :

La culture *in vitro* a été développée chez les agrumes dans les années 60. Elle est devenue un outil quasi indispensable en amélioration des plantes. Elle permet de multiplier végétativement du matériel, de faire du sauvetage d'embryons précoces, de l'embryogenèse somatique, et d'assainir des agrumes par microgreffage d'apex indemnes de maladie (Navarro *et al.* 1975). Le milieu le plus couramment utilisé est celui de Murashigeet Skoog (1962) et sa version modifiée par Murashige et Tucker (1969). Ce dernier est très utilisé pour le sauvetage précoce d'embryons avortés. (Froelicher, 2010)

5.1. Micro greffage d'apex et assainissement des plants d'agrumes :

Le micro greffage est une technique de multiplication végétative qui permet l'obtention de plants d'agrumes authentiques et sains. Cette technique est l'une des méthodes les plus utilisées dans les schémas de certification de différents pays producteurs d'agrumes. Elle permet l'obtention de têtes de clones ou ce qu'on appelle le matériel de pré base qui servira à son tour à produire des plants d'agrumes certifiés indemnes de maladies virales. Des essais ont été mis en place afin d'améliorer la conservation des fruits et des pépins du porte-greffe *Citrangetroyer* utilisé in vitro ainsi que le taux de réussite et le développement du greffon (Figure 09)

En effet, des essais de traitement fongiques durant trois mois ont montrés que l'utilisation du fongicide «Triziman » constitue le moyen le plus efficace grâce à son effet protecteur le plus élevé qui présente un pourcentage d'infection inférieur (56%) par rapport au Méthyl-tiphanate au Benlate (respectivement 75,7% 70,4%). Ainsi, et après cinq mois de suivi des essais, nous avons pu montrer que la nature et l'outil du moyen de conservation des pépins influent considérablement le pourcentage de germination. En effet, les pépins prélevés directement à partir des fruits de *Citrangetroyer* fraîchement récoltés assurent un pourcentage de germination plus élevé qui peut atteindre 100% par rapport aux pépins traités et conservés à 4°C dont le taux de germination ne dépasse pas 29% et dans certains cas il décroît jusqu'au 0%. Les essais menés sur l'effet de la variété sur le taux de réussite du microgreffage d'apex ont montré que le pourcentage obtenu varie d'une variété à autre. En effet, le Citronnier arbi présente le pourcentage de réussite le plus élevé avec (19%) alors que le taux de réussite est de 13% pour la Maltaise demi-sanguine et de 9% pour le Clémentinier Cassar

Concernant l'origine des pousses, les essais ont montré que le taux de réussite de micro greffage dépend aussi de l'origine des pousses utilisées. Les résultats montrent que le pourcentage de réussite est plus élevé pour les pousses prélevées directement à partir des pieds mères élevés sous anti-insectes par rapport à ceux prélevés sur des baguettes forcées in vitro sous condition artificielles.

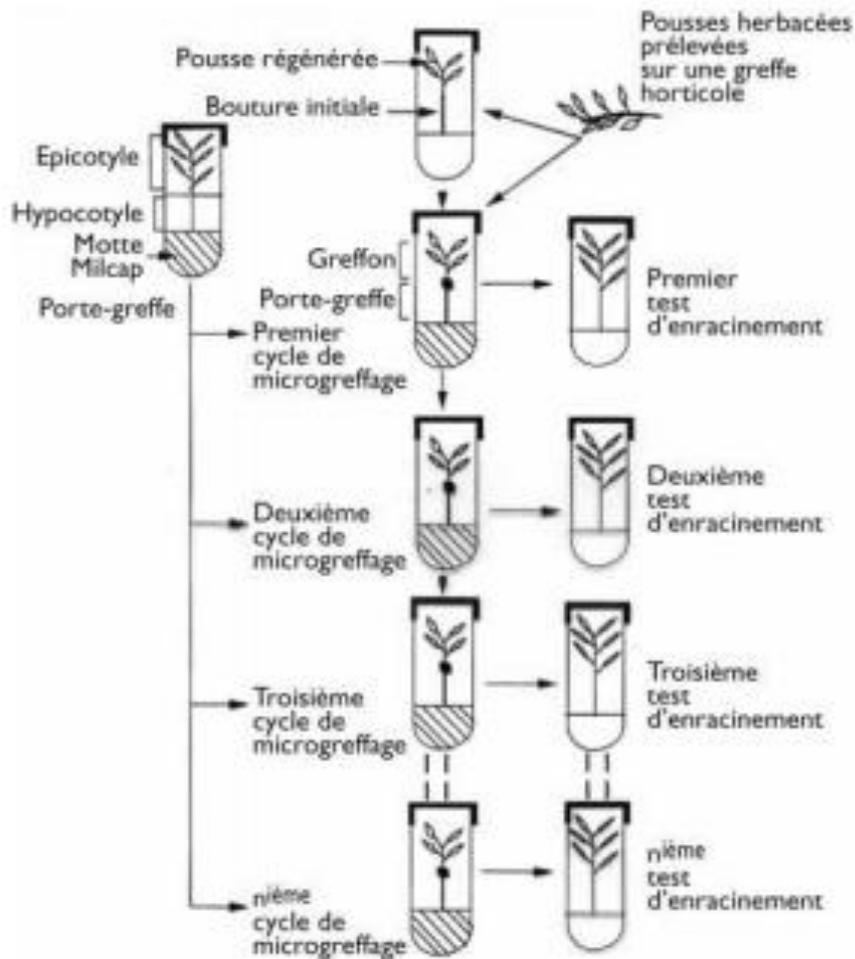


Figure 09 : schéma simplifié du micro greffage. (Mame.O, 2010)

5.2. Culture de protoplaste et hybridation somatique :

Les protoplastes sont des cellules végétales dont les parois cellulaires ont été retirées mécaniquement ou enzymatiquement ; Les enzymes fongiques telles que la cellulase, le macérozyme et la pectinase sont utilisées pour la digestion des parois cellulaires (**Cocking, 1972 ; Ruesink, 1971**).

Les protoplastes sont des cellules totipotentes et peuvent se régénérer en plantes fertiles dans des conditions optimales de culture tissulaire.

L'hybridation somatique est une technique développée dans les années 70 qui consiste à fusionner des protoplastes de deux parents génétiquement différents. Elle a pu être développée, chez un certain nombre d'espèces végétales, grâce à deux propriétés :

(1) la capacité d'obtention de protoplastes isolés en grande quantité, (2) leur totipotence. Cette étape de régénération de plantes à partir de protoplastes, est bien maîtrisée grâce aux nombreux travaux effectués sur plus de trois cent vingt espèces. Les premiers hybrides somatiques ont été obtenus après un traitement chimique au polyéthylène glycol (PEG) (**Kao et Michayluk 1974**). Le traitement au PEG induit l'agglutination des protoplastes et lors de la dilution de ce mélange avec une solution contenant une grande concentration de Ca^{2+} et un pH élevé, les fusions ont lieu. Cette technique reste actuellement la plus utilisée. (**Waara et Glimelius 1995**)

Au début des années 80, une autre technique permettant d'obtenir des hybrides somatiques par électro fusions de protoplastes a été établie. Les protoplastes placés dans un milieu ayant une faible conductivité, sont soumis à un champ électrique entre deux électrodes. Ce champ électrique créé par un courant alternatif permet la polarisation des protoplastes et leur alignement.

L'application, très brève, de courant continu de forte intensité désorganise temporairement les membranes et permet la fusion des protoplastes. Plus récemment, une nouvelle méthode combinant l'agrégation des protoplastes par le polyéthylène glycol et l'ouverture des pores membranaires par une décharge de courant continu a permis d'obtenir des hybrides somatiques (**Olivares-Fuster et al., 2005**). L'efficacité de la transformation reste généralement faible avec cette méthode (**Guo et al., 2005**).

Le faible taux de transformation peut être dû à diverses raisons, dont la dégradation enzymatique de l'ADN, le stade de la sous-culture de la suspension, le cycle cellulaire, le milieu de culture, le PEG et les facteurs environnementaux qui influencent la capacité des prototypes à se transformer qui influencent la capacité des protoplastes à exprimer leur totipotence et à se développer en plantes fertiles (**Davey et al., 2005**).

L'hybridation somatique permet ainsi d'introduire des gènes provenant d'espèces sexuellement incompatibles ou de génotypes stériles. Cette technique élargit ainsi grandement le pool des ressources génétiques disponibles (**Bravo et Evans 1985; Grosser et al., 1996a; Le François et al., 1993**).

Chez les agrumes, les cultures de cellules embryogènes en suspension ont été utilisées pour obtenir des protoplastes totipotents. Les premiers hybrides somatiques obtenus chez les agrumes proviennent d'une combinaison entre des protoplastes de cals embryogènes de *Citrus sinensis* ; et des protoplastes de feuilles de *Poncirus trifoliata* (**Figure 10**) (**Ohgawara et al. 1985**).

Ces deux espèces bien qu'appartenant à des genres différents sont compatibles sexuellement. Les premiers hybrides somatiques sexuellement incompatibles résultent d'une fusion entre *Citrus sinensis* et *Severinia disticha*. Afin d'introduire des caractères intéressants, des hybridations somatiques ont été tentées avec des espèces plus éloignées appartenant à des sous-tribus et même à des tribus différentes. Mais ces hybrides somatiques ne représentent qu'une faible partie du matériel régénéré. Seuls cinq hybrides somatiques inter sous-tribu ou inter-tribu ont pu être acclimatés soit sur leurs propres racines, soit après greffage.

5.2.1. Le transfert des gènes par les protoplastes :

Pour améliorer la sélection des plantes transgéniques, un système de sélection visuelle utilisant l'EGFP (enhanced GFP) a été mis au point pour faciliter la sélection des cellules, tissus ou plantes transformés. Avant cela, les protocoles de transformation de protoplastes médiés par PEG utilisaient des gènes de résistance aux antibiotiques pour l'identification des cellules transformées (**Kobayashi et Uchimiya, 1989 ; Vardi et al., 1990**).

Le marqueur basé sur l'EGFP a ensuite été utilisé pour sélectionner les plantes transgéniques transformées avec le gène de tolérance au chancre putatif Xa21 (**Guo et Grosser, 2004**) ou un gène de qualité du fruit. Des plants transgéniques de Hamlin ont également été produits avec des

constructions ARNi de Xa21 (**Omar et al., 2007**) et du virus de la tristezza des agrumes (**Olivares-Fuster et al., 2003**), en utilisant l'EGFP comme marqueur de sélection.

La fusion de protoplastes peut conduire également à la production d'hybrides somatiques diploïdes appelés cybrides. Ces nouvelles associations nucléo-cytoplasmiques peuvent être particulièrement intéressantes pour associer un noyau avec des organites cytoplasmiques présentant des caractères à déterminisme cytoplasmique particuliers tels que la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique mais également certains caractères de résistance. Chez les plantes, les cybrides sont généralement obtenus par fusion asymétrique entre des protoplastes parentaux respectivement irradiés aux rayons X et traités à l'iodoacetate. Sur agrumes, des cybrides ont été obtenus spontanément lors de fusion cal/feuilles ou cal/cal (**Grosser et al. 1996b ; Moreira et al. 2000a ; Ollitrault et al. 1996c ; Yamamoto et Kobayashi 1995**). Le taux de cybrides régénéré dans les produits de fusion peut être augmenté par certaines techniques tels que l'hybridation somatique mixte chimique/physique et les fusions asymétriques, après irradiation aux UV (Dambier, communication personnelle). Ces dernières années, des efforts ont été fait pour trans férer le génome mitochondrial des mandariniers qui possèdent des gènes de stérilité, avec des génomes nucléaires de divers agrumes fertiles. L'analyse moléculaire des génomes cytoplasmiques des produits de fusion montre que les mitochondries proviennent systématiquement du parent cal lors de combinaisons cal/feuilles. Ces auteurs suggèrent un contrôle mitochondrial dans l'aptitude à la régénération et le processus d'embryogenèse. Cependant, certains hybrides somatiques et cybrides issus de fusions cal/feuilles possèdent des mitochondries recombinées (**Liu et al.2002 ; Moreira et al. 2000a ; Vardi et al. 1987**).

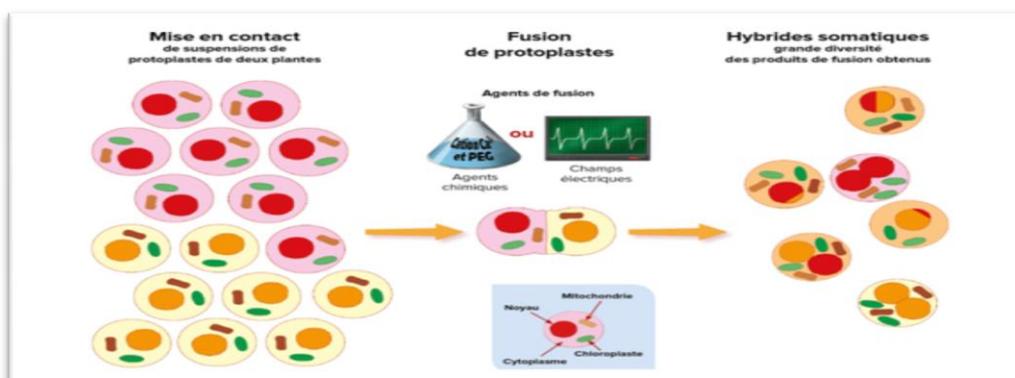


Figure 10 : schéma récapitulatif des deux méthodes de fusion des protoplastes.

(Gnis-Pedagogie-ORG)

5.3. Embryogenèse somatique :

L'embryogenèse somatique permet des taux de multiplication clonale élevés de matériel sain. Chez les agrumes, l'embryogenèse somatique est induite par la culture *in vitro* d'ovules d'espèces polyembryonnées (Figure 11). Elle peut aussi être induite par culture de styles (Carimi *et al.* 1995). Chez certaines espèces telles que les *Citrus*, la capacité de régénération d'une plante entière n'est conférée que par les protoplastes issus de calcs embryogènes. En effet, dans les conditions de culture utilisées, les protoplastes issus de mésophylles foliaires de *Citrus* ne présentent pas d'aptitude à la régénération. La constitution de collection de calcs embryogènes est donc un préalable à la mise en œuvre du programme d'hybridation somatique. (Froelicher, 2010).

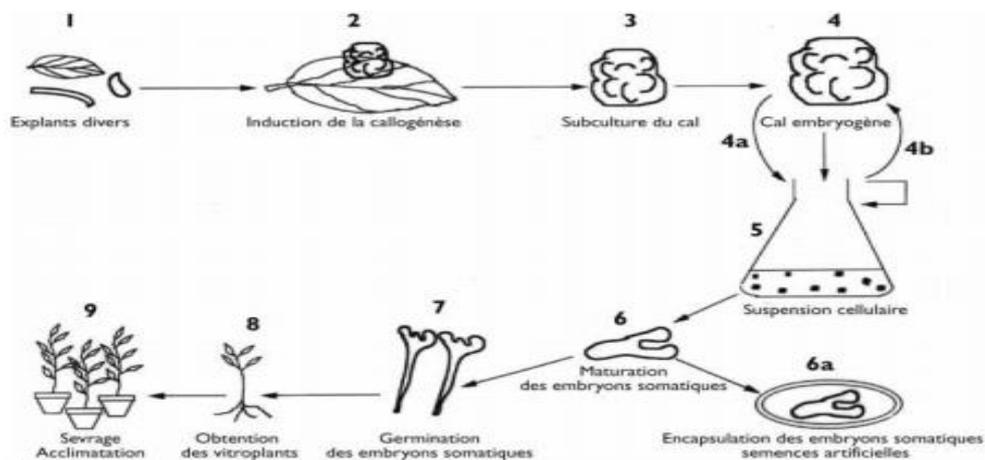


Figure 11 : schéma de l'embryogenèse somatique. (Mame.O, 2010)

5.4. Les haplo-méthodes :

5.4.1 L'obtention d'haploïdes par gynogénèse induite et androgénèse *in vitro* :

L'obtention de plants haploïdes a toujours suscité un intérêt en amélioration des plantes pour l'obtention de lignées pures avec les haploïdes doublés, en génétique pour la constitution de populations d'haploïdes doublés, pour la réalisation de cartes génétiques et récemment en génomique pour le séquençage d'un génome haploïde. Comme de nombreuses espèces ligneuses, les agrumes sont décrits comme étant récalcitrants aux haplo-méthodes. Des essais ont été réalisés par androgénèse *in vitro*.

Les premiers embryons ou/et des plantes haploïdes ont été obtenus chez *Poncirus* (**Hidaka et al. 1979**), *C. microcarpa* (**Chen et al. 1980**), *C. sinensis* "Trovia" (**Hidaka 1984**), *C. clementina* (**Germana et Chiancone 2003; Germana et al. 1994**), *C. limon* (**Germana et al. 1992**) et tangelo (*C. deliciosa x C. paradisi*) "Mapo" (**Germana et Reforgiato Recupero 1997**). Cependant, en dépit d'efforts considérables, l'androgénèse *in vitro* n'a donné aucun résultat chez de nombreux génotypes et le nombre d'haploïdes est très limité (**Germana 1997**). La faiblesse de l'androgénèse *in vitro* a poussé au développement d'autres méthodes alternatives (**Germana et Chiancone 2001**). Ainsi, la gynogénèse induite a été testée chez les espèces monoembryonnées. Les premiers haploïdes ont été obtenus après pollinisation de *C. clementina* et *C. reticulata* "Lee" (diploïde) par du pollentriploïde (**Oiyama et Kobayashi 1993**). L'induction d'haploïdes *in situ* par pollinisation avec du pollen irradié est une technique couramment utilisée chez certaines espèces. (**Froelicher, 2010**).

6. Transformation génétique des agrumes :

La recherche sur la modification génétique des agrumes résultant de l'incorporation d'un ADN étranger dans le génome a fait des progrès significatifs depuis que Kobayashi et Uchimiya, **1989** ont proposé l'incorporation directe d'ADN dans des protoplastes d'agrumes pour produire des plantes transgéniques. De la même manière, la biolistique utilise également l'apport direct d'ADN dans la cellule végétale (**Tomes et al., 1995**). Ces deux méthodes utilisent de l'ADN plasmidique purifié comme vecteur pour l'insertion d'ADN dans le génome. En plus de l'intégration directe d'ADN, *Agrobacterium* a été utilisé comme véhicule pour la livraison d'ADN et est devenu la méthode la plus utilisée pour la culture des agrumes. Les tissus d'agrumes juvéniles et matures peuvent être transformés en utilisant *Agrobacterium*. (**Maria Antonietta Germanà**).



Chapitre III

1. Avantages et inconvénients de la multiplication végétative *in vitro* :

1.1. Les avantages :

La micro propagation ou multiplication végétative par culture *in vitro* présente plusieurs avantages sur les méthodes conventionnelles de propagation.

Tout d'abord, cette technique permet la production massive de copies conformes d'individus-élites en un délai court comparativement au cycle de développement des espèces ligneuses forestières. L'efficience de la méthode réside dans l'augmentation à l'infini du nombre de plantes génétiquement identiques, copiées à partir d'un seul plant mère et qui sont des plants de qualité. Cette possibilité est offerte par le microbouturage *in vitro*. Elle a rendu possible le clonage, là où il n'existait pas. En effet, il est envisageable de multiplier *in vitro* des espèces récalcitrantes aux techniques horticoles classiques (bouturage, greffage, etc.) ou chez lesquelles les semences sont rares et/ou germent mal.

La production de copies non conformes par embryogenèse somatique permet d'appliquer des pressions de sélection dans le milieu de culture et de régénérer des variants somaclonaux adaptés à des conditions de stress telles que la salinité ou la sécheresse.

La production massive de plants nécessite peu d'espace à cause de la miniaturisation du système et peut être programmée indépendamment des saisons puisque tous les paramètres physiques sont maîtrisables en module de culture.

La qualité phytosanitaire des plantes reproduites *in vitro* est généralement supérieure à celle des plantes obtenues à partir de techniques traditionnelles pour plusieurs raisons :

- Des exemplaires conformes aux individus-élites soigneusement choisis sont uniquement reproduits,
- Tout *in vitro* plant contaminé est automatiquement éliminé car des sélections successives sont opérées au cours de la production *in vitro*.
- La culture en milieu aseptique fournit des individus vigoureux et plus résistants aux infections diverses et aux conditions climatiques défavorables.
- Le clone introduit est automatiquement assaini i. e. débarrassé des viroses et des bactérioses si la culture est initiée à partir de méristèmes.

Le coût de revient des plantes micro propagées est faible pour diverses raisons :

- Le grand nombre de plantes produites par rapport à l'unité de surface et au coût des matières premières utilisées, par exemple le milieu de culture, amortit le prix de revient,
- L'application de la technique ne nécessite pas une main-d'œuvre spécialisée et coûteuse. En effet, l'apprentissage et l'assimilation de la technique de bouturage in vitro peut se faire en quelques jours de formation.

Si l'on produit des embryons somatiques, il est possible de les conserver sous forme de semences artificielles réutilisables à la demande.

L'autre avantage indirect est que l'on peut conserver du matériel génétique in vitro sur un espace réduit plutôt qu'en serre. Ex. banques d'espèces ou de variétés en voie d'extinction conservées pendant plusieurs années (**Boxus et al., 1995**).

1.2. Les inconvénients:

L'utilisation de ces techniques pour la production massive de plants présente aussi des inconvénients.

Au niveau phytosanitaire, on connaît les risques de monoclonie si la production massive de plants est initiée à partir d'un seul clone. En effet, les copies conformes ayant le même pool génétique peuvent être rapidement attaquées et la production décimée en un temps record lorsque les plants sont transférés en conditions naturelles (ex. : attaques foudroyantes de *Marsonina brunea* sur certains clones de Peuplier). C'est pourquoi les généticiens forestiers préconisent l'emploi et l'introduction d'un grand nombre de clones dans les cas de multiplication végétative conforme (**Boxus et al., 1995**). Aussi, la notion de variété multiclonale a-t-elle été introduite.

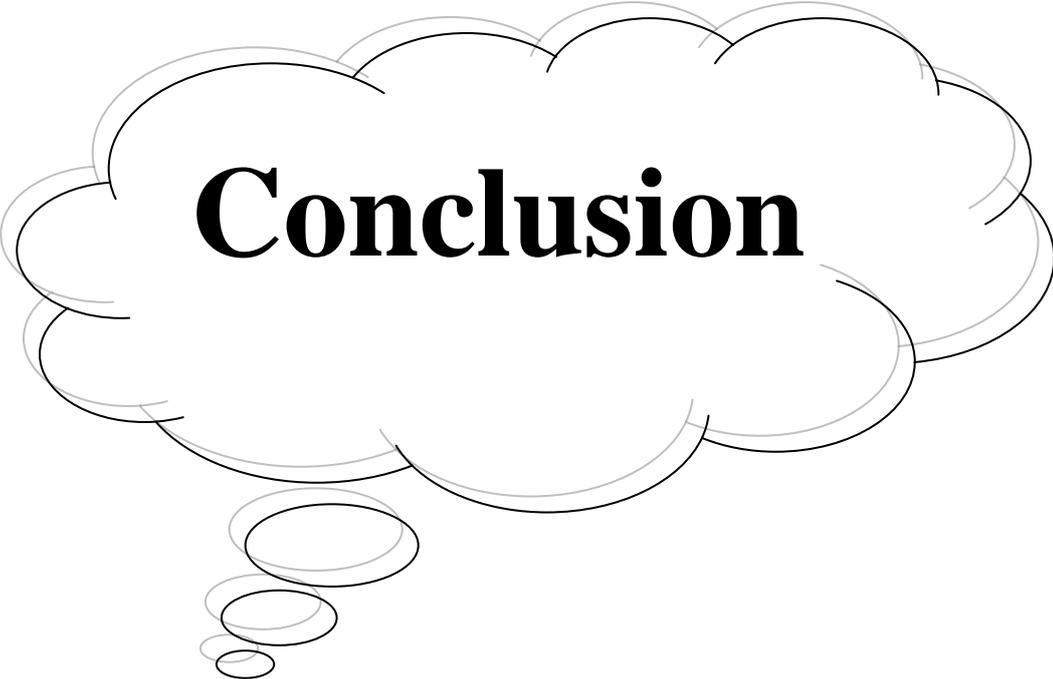
Dans ces conditions, eu égard au danger que représente la monoclonie, il est impératif pour les essences forestières de pratiquer une multiplication polyclonale in vitro. Cela permet de conserver une certaine variabilité dans les plantations et de prévenir une perte importante de plants en cas d'épidémie.

La plupart des individus-élites forestiers sont des sujets âgés qui ne possèdent pratiquement plus de parties juvéniles ou qui ne donnent pas de rejets de souches. Dès lors, il

est obligatoire de procéder au rajeunissement *in vitro* de l'espèce. La rejuvénalisation peut durer quelque temps, ce qui rallonge le délai d'obtention des *in vitro*-plants.

La phase d'acclimatation est l'un des facteurs limitant de la culture *in vitro*. Au cours de cette étape de sevrage en serre, le taux de mortalité des plantes issues de conditions *in vitro* peut être élevé, de l'ordre de 10 à 30 % ce qui représente une perte notable et non négligeable. Sauf si l'on dispose d'une serre adéquate où tous les paramètres physiques sont parfaitement contrôlés et que l'on ait une capacité de gestion pour une production à grande échelle.

La production de plants par embryogenèse somatique induit inmanquablement une variation soma clonale à cause de l'emploi de régulateur de croissance mutagène. Le nombre de variant somaclonaux ne doit guère dépasser 2 à 5 % de la production si l'on maîtrise le procédé. Autrement, l'utilisation de cette technique devient coûteuse et inintéressante pour une production en masse. De plus, le risque d'instabilité génétique des plantes peut être masqué si les anomalies génétiques ne s'expriment qu'au stade adulte. Ainsi, chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.), du fait de la floraison tardive de l'espèce (18 mois à 2 ans après transfert au champ), les anomalies du système de reproduction n'ont pu être décelées que tardivement (**Corley et al., 1986 ; Duval et al., 1988**). Les anomalies ont conduit à la formation de fruits anormaux ou à la stérilité partielle ou complète des arbres.



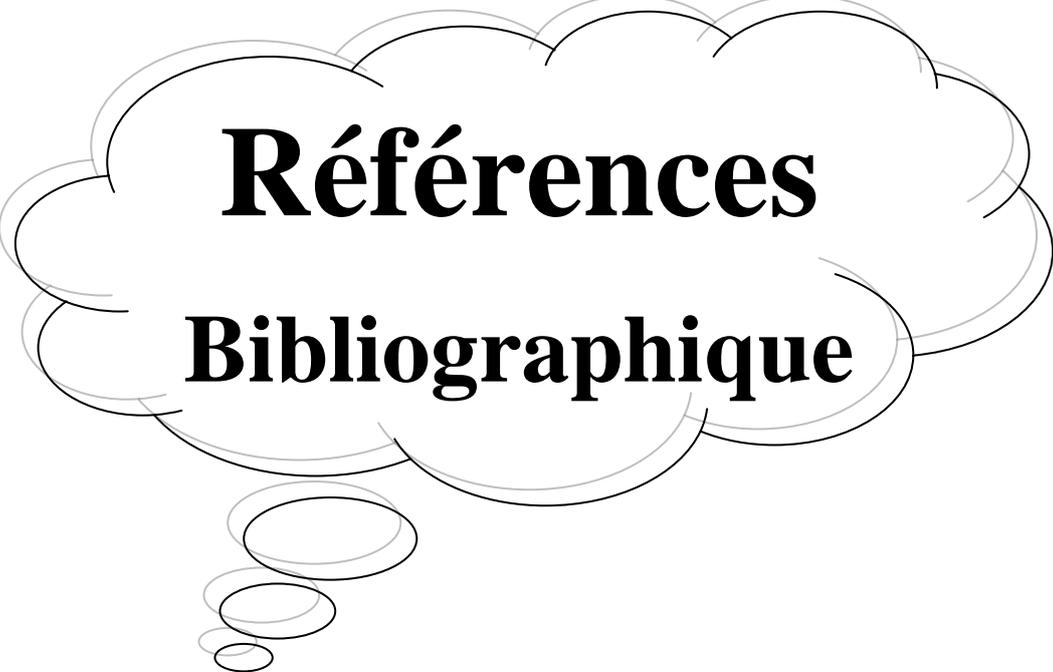
Conclusion

Conclusion

Malgré les nombreux travaux déjà réalisés et la très grande diversité génétique des agrumes offerts aux sélectionneurs, Les particularités du régime de reproduction et des structures génétiques de cette plante ont limité considérablement les progrès génétiques par hybridation contrôlée. Les avancées les plus spectaculaires ont été obtenues pour les porte-greffes grâce aux hybridations intergénériques des citrus.

Le développement des biotechnologies permet toutefois d'être plus optimiste pour les années à venir. Les techniques *in vitro* sont en effet très prometteuses, soit en soutien aux schémas de sélection classiques, soit par l'introduction de nouvelles approches. Les techniques de marqueurs moléculaires et de cytométrie en flux permettent de contrôler l'origine des plants dans les programmes d'hybridations sexuées et somatiques.

La multiplication végétative par micropropagation ou culture *in vitro* représente un outil puissant, aux perspectives industrielles et économiques nouvelles. L'identification des meilleurs clones, par des tests clonaux, et leur multiplication par embryogenèse somatique, permettront de maximiser les gains génétiques tout en respectant la diversité génétique. L'embryogenèse somatique s'avère, en effet, une technique très prometteuse, beaucoup plus efficace que le bouturage classique.



Références
Bibliographique

Références bibliographiques :

Barlass. M and Skene. K. G. M, 1986 : Biotechnologie in agriculture and forestry 1. (Citrus species), p207.

Badia N., 1981 : *Eucalyptus rudis*. Techniques de micropropagation par la culture de nœud in vitro. Colloque international sur la culture in vitro des arbres forestiers, IUFRO-AFOCEL, pp. 135-142.

Banks M.S., 1997 : Plant regeneration from callus from two growth phases of English ivy (*Hedera helix* L. Ed. Pflanzenphysiol., 92, 349-353.

Barbas E., 1987 : Contribution à la culture in vitro de Douglas. Rapport de stage du DEA. Université. Paris VI, 52p.

Bekaoui F., 1986. Microbouturage in vitro et culture de méristème de Douglas, problèmes physiologique lié à l'âge et au milieu de culture. Thèse. Université. Paris VI, 173p.

Benmahouil B., 2001 : Contribution à l'étude de la multiplication végétative in vitro du noyer commun « *Juglans regia* L. », thèse de magister, Université de Tlemcen, 85p.

Bessafa B., 1991 : Recherche sur l'amélioration des techniques végétative du peuplier blanc *Populus*, Mem, Mag. INA, 179P.

Bouillenne R., 1964 : Aspect physiologique de la formation des racines. Bull. Soc. R. Bot. Belg. 95:193, 204.

Boulay M., 1979 : Propagation in vitro du Douglas par micropropagation de germination aseptique et culture de bourgeons dormants. In : micropropagation d'arbres forestiers. AFOCEL. 6 : 7-75.

Boutherin D. et George B., 1989 : La multiplication des plantes horticoles. Ed. Technique et documentation, pp. 47-95.

Bouzaïd S., 1995 : Quelques traits de comportement de boutures de citrus en culture in vitro. C.R. Acad. Sc, Paris, 280p.

Caballero M : Reproduction de l'Olivier par bouturage semi-ligneux sous nébulisation In: Yakoub- Bougdal S., 2005. Morphogénèse in vitro du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) et de l'olivier européen L. var. Chemlal. Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri-Tizi Ouzou, 191p.

Cassin J., 1971 : Diversification agrumicoles et travaux de recherche agronomiques de San-Guiliano en Corse- colloque agrumicole du Catania-Paterno. Doc. 12p.

Chaperon H, 1979 : Maturation et bouturage des arbres forestiers, AFOCEL, 12: 19-31.

- Champagnat P., 1955 :La notion de facteurs de préseances entre bourgeons. Bulletins de la société botanique de France, Tome 116, N°7-8, Paris, pp. 323-348.
- Champagnat., Ozenda et Billaud., 1969 :Biologie végétale : la croissance. Ed. Masson. Tome III, PP, 62-78.
- Creté P : Précis de botanique. Systématique des angiospermes. Tome II. Ed : Masson. Paris, 218-220p.
- Cornu D., Riffaud J. L. et Capelli et al., 1981 :Obtention de plantes de pin maritime (*Pinus pinaster*) à partir de brachyblastes ou d'apex caulinaires de très jeunes sujets cultivées in vitro.
- David H et Thomas M. J., 1979 : Organogenèse végétative in vitro chez les angiospermes. Ann. Biol, 18, 381-416.
- De pommier D., 1981 :Culture in vitro d'eucalyptus résistant au froid. Influence de quelques facteurs sur l'allongement et l'enracinement des plantules. D.E.A. Nancy I, 1982.
- El-Morsy A. A et Millet B., 1996 :Rhythmic growth optimization of micropropagation: The effect of excision time and position axillary buds on in vitro culture of citrus aurantium L. Annal of Botany. Faculté des Sciences. France, 78.197-202.
- Encyclopedie Encarta., 2005 : FAO., 2004.
- Froelicher.y, 2010 :amelioration genetique des agrumes :gestion de la diversité et de la ploïdie, universite de corse – pascal paoliufr des sciences et techniques.
- Favre J. M., 1980 :Rhizogenèse et bouturage. La multiplication végétative des plants supérieurs. Chaussat et Bigot éditeurs. Guatiers-Villars, Paris, pp, 51-57.
- Fege A et Brown G., 1984 : Carbohydrate distrubution in dormant populus shoot and wood cutting. Forest sciences.USA. University of MINNRSTA, 30p.
- Francllet A., 1981 : Rajeunissement et propagation végétative des ligneux. Annales AFOCEL 1980, 11-40.
- Frost H.B., 1938 : Nucellar embyony and juvenile characters in clonal varieties of Citrus, Ed. J. Hered., 29, 423-432.
- Gallais. A, Bannerot. H, 1992 : Amélioration des espèces végétale cultivées. Ed. INRA, Paris, p. 243.
- Giladi 1., Alltman A et Goren R., 1979.
- A method for aseptic culture bud explant from Citrus tree. Sci. Hort, 10: 357-362.
- Goutier J et Guegen M., 2001 :La multiplication des plantes. Encyclopédie pratique. Ed. BORDAS HER, p. 320.

Gautier M., 1988 :«Arboriculture fruitière». Les productions fruitières. T. II. VI. Ed: J.B. Baillièrè, Paris1988.

Hassanein AM et Azouz M.M., 2004 :Propagation de Reticulata de citron par l'intermédiaire des découpages in vitro de germination et de pousses de graines Revue. Biologia plantarum. Vol 47, pp. 173-177.

Heller R., 1953 :Recherche sur la nutrition minérale dans les tissus végétaux cultivés in vitro. Ann,Sci, Nat. Bot, 14, 1-223.

Hidaka T., et Kajiura I., 1979 :A simple method for acclimatization of in vitro plantlets of Citrus. Bull. Fruit free Res. Snt. B., 19-28.

Labtahi Fet Boughdoura N., 1996 :Multiplication végétative in vitro du sapin de Numidie (Abies numidica) De Lannoy, INRF, Alger, 1er rencontre national en biotechnologie végétale, p.45-51.

Loussert R., 1989 : Les agrumes. Ed. Lavoisier. Vol 1 et 2, 220p.

Loussert, R. (1992) : Los agrios. Mundi-prensa.

MAME.O, 2010 : le projet majeur africain de la grande muraille verte, 140-142p.

Maria Antonietta Germanà :Pablo Alezac , Jude W. Grossera , Manjul Dutta , Nian Wangd , Jose Cuencac , Prabhjot Kaura.

MARTIN, C., & CARRÉ, M : La multiplication végétative in vitro des végétaux ligneux.

Paraloran J.C., 1971 : Les agrumes. Ed; Maisonneuve et la rose. Paris. 565p.

Polese J. M (2008) : La culture des agrumes. Édition artémis. pp 94.

Rapport : Amélioration génétique des principales espèces fruitières, 22-46.

Soost RK (1987): Breeding citrus genetic and nucellar embryony. In:Improving vegetatively propagated crops, (A Abolt and R Atkin, eds) London, UK, Academic Press, 83-110.

Tanaka T., 1954 :Speciespreblem in Citrus. Uneo, Tokio. Japanese. Society for the promotion of science. In : Paraloran J. C., 1971. Les agrumes. Ed. Maisonneuve et la rose, Paris, 565p.

Webber H., 1967 :Citrusindustry. Univ of California. Vol 1, pp. 1-3. In : Loussert R., 1989. Les agrumes. Ed. Lavoisier. Vol 1 et 2, 220p.

Site web :

<https://www.pomum.fr/p=67>

<https://microbenotes.com/micropropagation-stages-types-applications-advantages-limitations/>

