

## Bilan de l'assainissement des variétés de Mandarinier et de tangelo de la collection d'El Menzeh

Handaji N., Arsalane N. et Elyouri M.  
B.P 1055 INRA, El Menzeh, Kénitra, Maroc

### Résumé

*Le présent travail s'inscrit dans un programme de sélection sanitaire des agrumes, mené par l'Institut National de la Recherche Agronomique (Maroc). Ses objectifs sont la conservation du germoplasme, le rajeunissement de la collection nationale d'agrumes et la production des plants d'agrumes sains et indemnes des maladies virales et bactériennes.*

*53 variétés de mandarinier et de tangelo ont été assainies par le micro greffage d'apex combiné avec la thermothérapie et 34 variétés polyembryonnées de mandarinier par la sélection nucellaire.*

*Le taux de réussite de reprise de micro greffage a été de 46 % à 100 % respectivement en 1994 et 1997. Celui du deuxième greffage a atteint 66 % en 1997. Les résultats de l'indexage biologique montrent que 43 % des variétés de mandarinier et de tangelo se sont révélées indemnes de maladies.*

*Les plantules nucellaires sont issues de semis de graines de 34 variétés de mandarinier polyembryonnées et greffés sur le bigaradier. Avant leurs plantations, 340 plants nucellaires ont été indexés pour contrôler leurs états sanitaires vis à vis de la psorose. Ceux qui se sont révélés sains, ont fait l'objet d'une étude pomologique pour confirmer leurs authenticités variétales.*

**Mots clés :** Agrumes, mandarinier, Tangelo, micro greffage d'apex, sélection nucellaire, indexage biologique, thermothérapie

## Abstract : Decontamination result of cultivars mandarins and tangelos in El Menzeh germplasm 1994-1998

*The present study was carried out at El Menzeh in citrus disease resistance selection programme, released by Agronomic Research National. The objectives were conserving germplasm, rejuvenating national citrus collection and producing plants of citrus free of the known die-back disease. For this purpose, 34 mandarins polyembryonic cultivars have been checked by selection nucellar and 35 mandarins and tangelos have been checked by tip microgreffeting combining with thermotherapy.*

*The result rate of meristem grafting vary from 46% in 1994 to 100% in 1997. The result rate of second grafting vary 0% in 1994 to 66% in 1997. So 43% mandarins cultivars have revealed healthy after biological control.*

*The nucellar plants obtunded from polyembryony mandarins seeds. They are revealed healthy from psorose. Then they are planting for verifying cultivars authenticity.*

**Key words :** Citrus, mandarin, Tangelo, tip microgreffeting, nucellar selection, thermotherapy, biologic control

### ملخص : نتائج تطهير أصناف الحوامض بالمجموعة الوراثية بالمنزه 1998-1994

هندجي ن.، أرسلان ن. و البيوري م.  
المعهد الوطني للبحث الزراعي، القنيطرة

في إطار الحفاظ على المجموعة الوراثية للحوامض بالمنزه، أنجز المعهد الوطني للبحث الزراعي ببرنامج تطهير بعض أصناف المنذرين (Mandarines) و طنجلو (Tangelo) من الأمراض الفيروسية. و إظهار شتائل أو غرسات سالمة.

لقد تم تطهير 53 صنف من المنذرين بواسطة تطعيم البارض فوق المطعم (microgreffage d'apex) و كذلك 34 صنف آخر بواسطة اختيار الشتيلة المماثلة للنبات الأم (sélection nucellaire).

**الكلمات المفتاحية :** الحوامض، المنذرين، طنجلو، تطعيم البارض، اختيار الشتيلة

## Introduction

Comme la plupart des espèces fruitières, les agrumes sont attaqués par de nombreuses maladies transmissibles par les greffons. Celles-ci provoquent la défoliation de l'arbre, une diminution de la productivité, et affecte la qualité des fruits. Au Maroc, 70 % des arbres sont contaminés par une série de maladies à virus, à viroïdes et à mycoplasmes dont les plus répandues sont les psoroses, l'exocortis, la cachexie-xyloporose et le stubborn (Anonyme,

1993). La maladie du stubborn, à elle seule, provoque une réduction de la production de 40 % (Anonyme, 1993). Par contre, l'impétriature ne semble pas constituer un danger pour le Maroc (Hafidi, 1993). La cachexie-xyloporose et le stubborn ne sont transmissibles ni par insectes vecteurs ni par graine (Childs et al., 1965 ; Norman et Childs, 1963). Les particules virales de la tristeza ne sont pas transmises par la graine mais par quelques espèces de pucerons (Chapot et Delucchi, 1964). La psorose, peut quelquefois être transmise par la graine ou par insectes vecteurs (Bridge et al. 1965). La transmission de l'exocortis ne semble se faire que par usage de greffons préalablement infectés.

Pour les techniques de détection de maladies, l'indexage biologique reste la technique la plus usuelle pour les plantes ligneuses et particulièrement les arbres fruitiers (Vogel, 1973; Vogel et Bove, 1976 et Hugard, 1982). Les tests ELISA (Enzyme-linked-Immuno-Sorbent-Assay) et les tests calorimétriques permettent l'identification de la tristeza et la détection du stubborn (Fleq et Clark, 1977). En plus, d'autres techniques de marqueurs moléculaires ont été mises en évidence par Duran Vila et al. (1988) et Carnana et al. (1995).

La production des plants sains est obtenue par la *thermothérapie* qui consiste à soumettre le matériel végétal à des températures alternantes 40°C pendant 16 h le jour et 30°C pendant 8 h la nuit (Nicoli, 1984) ou 30°C pendant 16h et 35°C pendant 8 h (Taoudi, 1994). Aussi, le micro greffage d'apex développé par Navarro et al. (1975) permet d'éliminer les virus chez les citruses. Boxus (1995) a confirmé que le taux de reprise des apex greffés est meilleur si les explants proviennent d'un matériel végétal juvénile ou prélevé sur des pousses herbacées ou des bourgeons dormants d'arbres adultes.

Plusieurs travaux ont montré que le méristème est indemne de maladie (Warg et Hu, 1980 et Warg et Charles, 1991). En fin, la sélection nucellaire permet de reproduire par semis des plants identiques à l'arbre mère, indemne de maladie à l'exception de la psorose. Le taux de la polyembryonie varie d'une variété à une autre, le Citrange troyer (98 %), Rough lemon (98 %), Oranger (80 à 85 %), Satsuma (84 à 90 %), Bigaradier (80 à 85 %), Poncirus trifoliata (80 à 85 %) et 100 % chez les Tangelo Sampson et les mandarines Kara et King (Renther et al., 1988). Par ailleurs, les variétés monoembryonnées sont les clémentiniers, les pamplemoussiers, Les bergamotiers, les citronniers Meyer et quelques mandariniers (Wilking, Temple, Ellendale). La distinction des plants nucellaires des zygotiques peut être faite par les marqueurs morphologiques, génétiques ou enzymatiques.

L'Institut National de la Recherche Agronomique a réalisé un effort considérable dans le domaine de la sélection sanitaire des agrumes aussi bien par la sélection nucellaire, méthode employée depuis le début des années soixante, que par le micro greffage d'apex adopté dans les années quatre vingt dix. Ce travail a été entrepris par le Programme National de Recherche sur les Agrumes. Ses objectifs sont la conservation du germoplasme, le rajeunissement de la collection nationale d'agrumes et la production des plants d'agrumes sains et indemnes des maladies virales et bactériennes.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Les variétés de mandarinier et de tangelo, issues de la collection d'El Menzeh, ont fait l'objet de l'assainissement par le micro greffage d'apex (Tableau 1), ou la voie nucellaire (Tableau 2), qui sont deux méthodes complémentaires.

**Tableau 1.** Variétés de mandarinier et de tangelo assainies par le micro greffage d'apex (INRA/El Menzeh)

1994	1995	1996	1997
Kara nuc	Tangerine P1 604 nuc	Dancy nuc	Satsuma saigon vc
Lee nuc	Ortanique nuc	Mandarinette vc	Clemetine Nulès vc
Tangelo Sanjacentivo	Tangerine Sweet nuc	Wilking	Tangelo Orlando nuc
Murcott honey nuc	Tangerine Sweet nuc	Dancy vc	Lee nuc
Mandarine commune	Tangelo Orlando vc	Tangerine p1 604 nuc	Tangelo Clement
Kinnow nuc	Emperor nuc	Batangas	Batangas
Tangelo Mineola nuc	Satsuma Wase vc	Tangerine Swett nuc	
Kunembo nuc	Nouvelle Calédonie nuc	Tangerine Kinnow vc	
King of Siam vc	Chuika nuc	Satsuma Frost nuc	
Osceola nuc	Murcott honey nuc	Tangelo pina vc	
Dancy Frost	Kara nuc	Oneco vc	
Chienka nuc	Emperor vc	Kunembo vc	
Tangelo pina nuc	Osceola nuc	Tangelo Clement	
Lee vc	Lee nuc	Kara vc	
Kinnow vc	Tangelo pina nuc		
	Tangelo Sanjacentivo vc		
	Tangelo Sunshine nuc		

**Tableau 2.** Variétés de mandariniers assainies par la voie nucellaire (INRA/El Menzeh)

Variétés de mandarines	
1- Scarlette emperor	18- Beauty of Clean
2- Houang michiech	19- De wild
3- De japon	20- Xen kouang
4- Vermillian Houang Yen	21- Polynesie
5- Weshart	22- De Canton
6- Suen Kat	23- Satsuma Wase
7- Tao Chieh	24- Dezfoul

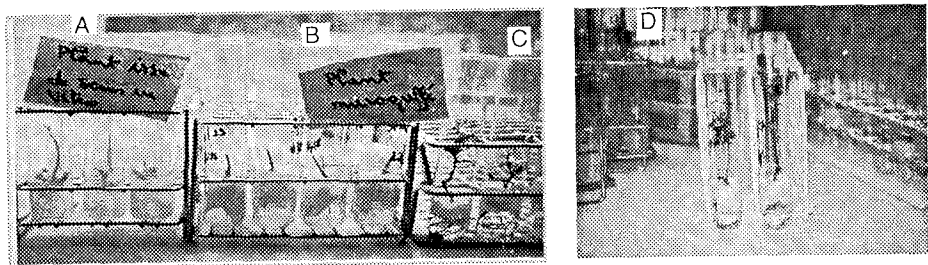
**Tableau 2. Suite**

8- Honey	25- Nouvelle calédonie
9- Carvalhal	26- Zanzibar
10- Suen	27- Batangaz
11- Vohansay	28- Nicaragua à fleurs b.
12- Vohangisahy Ifranisa	29- Nicaragua à fleurs pourpres
13- Subtetonnée	30- Cravo
14- Sunki	31- Nobilis du japon
15- Vohanisahy Brikaville	32- Chow chow tienchich
16- Indouchine	33- Kunembo
17- A peau lisse	34- Muen sui change

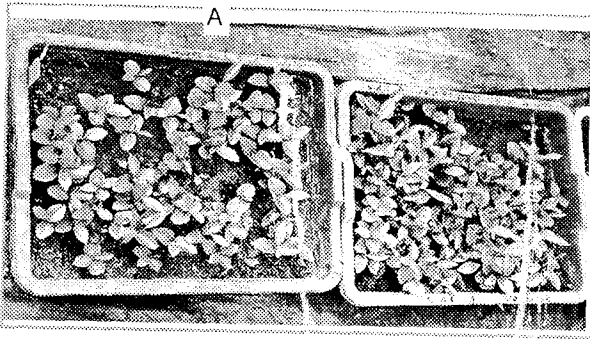
## Méthodes

Par la voie de micro greffage d'apex (Figure 1), les variétés ont été greffées et placées dans une chambre de thermothérapie. Les graines de *Poncirus trifoliata* ont été décortiquées et mises en culture *in vitro* dans un milieu solide de Murashig et Skoog (1962). Le greffage de l'apex sur des plantules de *Poncirus trifoliata* se fait dans des conditions aseptiques. Le deuxième greffage se fait au niveau de la serre à une température de 27°C, une hygrométrie de 80 % et une photopériode de 16 heures. Les plants greffés ont été placés sous sacs de polyéthylène transparents dès leur entrée en salle d'élevage pendant deux semaines environ. Six mois après le deuxième greffage, les plants micro greffés sont contrôlés par l'indexage biologique sur 6 à 12 mois selon les maladies à détecter et seuls les plants indemnes, ont été plantés directement au champs.

Par la voie nucellaire (Figures 2), les plants issus de semis de 34 variétés de mandarinier ont été repiqués, greffés et indexés contre la psorose. Ces plants nucellaires indemnes ont été plantés au Domaine Expérimental de Tazi pour vérifier leur authenticité variétale.



**Figure 1.** Différentes étapes de micro greffage d'apex, (A) : Semis des porte greffes *in vitro*, (B,C, D) : Plantules micro greffés



**Figure 2.** Différentes étapes de la voie nucellaire, (A) : semis des variétés in vivo, (B.) : Repiquage des plants nucellaires



## Résultats et discussions

### Micro greffage d'apex

En 1994, 15 variétés de mandarinier et de tangelo sont assainies par le micro greffage d'apex combiné avec la thermothérapie au niveau de laboratoire de la culture in vitro à El Menzeh. 37% des variétés ont donné de bons résultats par le micro greffage d'apex avec un taux de réussite de 46%. Ce taux est de 94%, 86% et 100% respectivement en 1995, 1996 et 1997 (Tableau 3). La maîtrise de cette technique a une grande influence sur la réussite de micro-greffage, notamment, la taille de l'explant (0,2 à 0,3 mm), la plante mère juvénile (1 à 2 ans), le milieu de culture et les conditions de mise en culture in vitro et l'acclimatation.

Le sur-greffage des plantules micro greffées n'a pas donné de bons résultats en première année, alors que pour les deux autres années, le taux de réussite varie de 33% et 66% (Tableau 4). Le sur greffage nécessite des conditions favorables pour un bon démarrage de la croissance des greffons, telles qu'une température moyenne de 27°C et une photopériode de 16 heures.

## Sélection nucellaire

Parmi 80 variétés de mandarinier polyembryonnées groupées dans la collection d'El Menzeh, 34 sont assainies par la voie nucellaire. Après l'indexage biologique, elles se sont révélées indemnes de la psorose.

**Tableau 3.** Synthèse des résultats de micro-greffage d'apex (El Menzeh, INRA)

Année	1994	1995	1996	1997	Total
Nombre de variétés (micro greffage effectué)	15	17	15	6	53
Nombre de variétés (micro greffage repris)	7	15	13	6	41
Pourcentage de réussite (%)	46	94	86	100	77

**Tableau 4.** Synthèse des résultats de sur-greffage (El Menzeh, INRA)

Année	1994	1995	1996	1997	Total
Nombre de variétés (sur greffage effectué)	7	15	13	6	41
Nombre de variétés (surgreffage repris)	0	10	8	2	20
Pourcentage de réussite %	0	66	60	33	48

## Conclusion

Par le micro-greffage d'apex combinés avec la thermothérapie, 20 variétés de mandarinier et de tangelo se sont révélées saines après l'indexage biologique. Aussi par la sélection nucellaire, 34 autres variétés de mandarinier se sont révélées indemnes de la psorose. Grâce à l'expérience acquise, les pourcentages de reprise de micro greffage d'apex et de sur greffage ont été améliorés et les délais d'obtention d'un plant indemne est réduit. La régénération d'autres variétés de la collection d'agrumes et l'étude de conformité pomologique des variétés assainies par la voie nucellaire sont en cours.

La technique de micro greffage d'apex combinée avec la thermothérapie est une voie extrêmement prometteuse pour assainir les variétés d'agrumes. En plus de son efficacité, elle est rapide et permettant une reproduction fidèle des variétés d'agrumes dépourvues des caractères juvéniles.

La sélection nucellaire est une technique facile et moins chère, mais elle est assez longue, limitée que pour les variétés polyembryonnées et nécessite un greffage successif pour éliminer les épines.

## Références bibliographiques

- Boxus P. 1995. Multiplication Végétative: Micro propagation et Embryogénèses somatiques. UNUSAT Université/ AUPELF. UREF.
- Carnana L. M., Nicoli M. et Chabrier, 1990. Utilisation et adaptation du système Spage pour la détection des viroïdes des agrumes en Corse.
- Chapot, h. Deluchii V.L. 1964. Maladies à virus. In maladies, Troubles et ravageurs des agrumes au Maroc, pp. 5-49 INRA Rabat.
- Cassin J. 1972. sélection nucellaire et hybridation, facteurs d'amélioration et de diversification des variétés d'agrumes cultivées fruit 27(1), 21-35.
- Child .L. et J.B. Carpenter. 1960. Observations on stubborn and other diseases of citrus in Morocco- Plant Disease Reporter,44-12, pp. 920-927.
- Duron V.N., Roistacher C.N, Bustamante, R. et Semancik, S. 1988. A. Definition of citrus Viroïd groups and their relationship to-Exocortis disease.J. gen virol 69 : 3069-3080.
- Garanscy S. M., Christie R.G., Derrick S. et Barjoseph M. 1980. Detection of citrus tristeza virus Light and Electro-microscopy of inclusion and viral particles. Proc 8 the coffee IOCVRiv. Erclide : 9-16.
- Hassani A. 1994. Contribution à l'amélioration des techniques de microgreffage in vitro de mandarinier. Thèse. I.A.V. Hassan II.
- Hafidi M. 1993. Cours sur les maladies virales à viroïdes et à mycoplasmes des agrumes, 14p.IAV Hassan II -Agadir.
- Hugard J. 1982. Cours d'arboricultures fruitières générales. ENSAM Montpellier Sup.
- Jonard R., Hugard J., Marcheix J. Chancel L., Possel J.L. et Villemur P. 1983. In vitro micrografting and its applications to fruit science. SC.20 : 521- 530.
- Juarez.J, Navarro, L. et Gardiola, J.L. 1976. Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentinier au moyen de la culture nucellaire in vitro Fruit 31 (12) 751- 762.
- Loussert, R. 1989. Les agrumes. Techniques agricoles méditerranéennes. Collection dirigée par P. Moati, Vol 1, Doc. Lavoisier, Paris, 113pp.
- Margara J. 1982. Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogénèse. Publication de l'INRA. 263pp.
- Murasig T. and, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bia assaus with *Tabbaca* tissue-cultures : *Physiol. Plant* 15.473.497.
- Navarro L. Roistacher.CN, et Murashige,T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus Free citrus J. Amer-Soc Hort: Sci 100 (5) : 741-479.
- Navarro L. et Juarez, J. 1977. Tissue culture technique used in Spain to recover virus- Free Citrus plants *Acta. Horticulturea* 78 : 425-435.
- Nicoli, M. 1985. La régénération des agrumes en Corse par la technique du microgreffage des méristèmes in vitro. *Fruits* 40 (2) : 113-134.2.
- Rangan T.S, murashige,T. et Bitiers,W.P, 1968. In vitro initiation of nucellar embryo in monoembryonic citrus *Hort. Science* .3 : 226-227.
- Renther W., Batchelor L.D. et Weeber H.J. 1972. Citrus Industry.



---

Taoudi S. 1994. Morphogénèse in vitro chez le clementinier: Etude du Matériel végétal, Juvenil, Adulte, végétatif, Reproducteur et microgreffé. Thèse -Faculté de Science/Rabat

Vogel R. 1973. L'amélioration sanitaire des agrumes par l'indexation. Rapport DEA, 55p

Vogel R. Bove J. 1976. La nouvelle Technique d'indexation de la cachexie- xyloprose. Son utilisation en Corse Fruits 31 (2) : 93-96

Vogel R. Bove J., Nicoli M. 1988. Le programme de sélection sanitaire des agrumes. Fruit Vol. 43 n°2.

Wang P.J. et Hu C.Y. 1980. Regeneration of virus-free plants through in vitro culture. In : "Advances in biochemical engineering 18. Plant cell cultures II "Springer-Verlag. Berlin p.p. 61- 99.

Wang P.J. et Charles A. 1991. Micropropagation through meristeme culture in Biotechnology agriculture and forestry vol. 17. High-tech and micro propagation "Ed. Y.P.S. Bajaj. Spring. Berlin P ; P. 32-52.