

Effet de la composition du milieu de culture sur l'induction et le développement des cals de porte-greffes d'agrumes

Essafi N.E.¹ et Abousalim A.²

¹Institut National de la Recherche Agronomique, El Menzeh, B.P. 293, Kénitra, Maroc

²Département d'Horticulture, IAV Hassan II, B.P. 6202, Instituts (10100), Rabat, Maroc

Résumé

*L'élargissement de la gamme de porte-greffes et variétés est une des priorités du secteur agrumicole en vue de surmonter certains problèmes entravant le développement de ce secteur, entre autres la tolérance à la salinité, au calcaire et aux maladies parasitaires. L'intégration des biotechnologies dans le programme de sélection des agrumes est une alternative très prometteuse pour relever ces défis. Divers travaux sont menés sur l'application des techniques de culture in vitro, entre autres pour l'obtention de variants somaclonaux ; et le développement d'un milieu de culture approprié une étape principale dans le processus de régénération de plants. Aussi, le présent travail a pour objectif la sélection d'un milieu de culture et de la concentration d'auxine propices à l'induction et au développement des cals de deux porte-greffes d'agrumes. Trois milieux MS (Murashige et Skoog), 1/2MS (macro de MS dilués de moitié) et MST (vitamines substituées par celles de MT), additionnés de 0.2 ou 0.4 mg/l de 2,4-D ont été testés et deux porte-greffes ont été utilisés. L'induction de cals de *Poncirus trifoliata* et de *Citrus aurantium* a significativement été améliorée en présence de 0,4 mg/l dans le milieu MST de 2,4-D (95%) comparativement à 0.2 mg/l. Après 12 semaines de subcultures, les caractères quantitatifs et qualitatifs mesurés (hauteur, surface, poids frais et poids sec) ont révélé la supériorité du milieu MST, comparativement à MS et 1/2MS, pour la prolifération des cals, sans différence significative entre les deux porte-greffes testés. En conclusion, le milieu MST additionné de 0.4 mg/l de 2,4-D peut être retenu pour l'induction et le développement des cals des deux porte-greffes *Poncirus trifoliata* et *Citrus aurantium*. Aussi, la surface des cals, méthode non destructive, peut convenablement être utilisée pour estimer les poids frais et sec du fait de la présence d'une très bonne corrélation entre ces paramètres.*

Mots clés : agrumes, porte-greffe, milieu de culture, 2,4-D, in vitro

Abstract : Effect of the composition of the culture medium on callus induction and development of Citrus rootstocks

Enlarging rootstock and varietal profile is considered as a priority in order to overcome certain problems facing the citrus sector such as tolerance to salt, calcium and diseases. Integrating biotechnology tools within the selection program is a promising approach to overcome such challenge. Several studies are using *in vitro* culture techniques to obtain somaclonal variation; and developing an appropriate culture medium is the prime step in the plant regeneration process. The main objective of the present study is to select adequate culture medium and auxin concentration for callus induction and development of two Citrus rootstocks. Three culture media MS (Murashige et Skoog), 1/2MS (MS with half strength macronutrients) and MST (vitamins replaced with those of MT), supplemented with 0.2 or 0.4 mg/l de 2,4-D have been tested and two rootstocks have been used. Callus induction from *Poncirus trifoliata* and *Citrus aurantium* increased significantly in the presence of 0.4 mg/l of 2,4-D (95%) in comparison with 0.2 mg/l. Following 12 weeks of subculture, the measured quantitative and qualitative parameters for callus proliferation showed the superiority of the medium MST (modified MS, using Murashige & Tucker (1969) vitamins), in comparison with MS and 1/2MS, with no significant difference between the two tested rootstocks. In conclusion, MST supplemented with 0.4 mg/l 2,4-D has been retained for callus induction and development of both rootstocks *Poncirus trifoliata* and *Citrus aurantium*. Also, callus surface seemed to be a good non destructive parameter to estimate callus fresh and dry weights.

Key words : Rootstock, Citrus, culture medium, 2,4-D, *in vitro*

ملخص : دراسة تأثير المحلول الغذائي على نمو الكالس عند حاملي طعم الحمضيات

الصافي ن.1، ابوسالم ع.2

¹ المعهد الوطني للبحث الزراعي، الفينطرة

² المعهد الحسن الثاني للزراعة والبيطرة، شعبة البستنة

يعد تنوع الأصناف و حاملي الطعم من الأوليات بالنسبة لقطاع الحوامض و ذلك لتجاوز بعض المعوقات و التي نذكر منها معوقة الملوحة و الأمراض.

ويعتبر اعتماد التقنيات الحيوية، و منها زراعة الأنسجة، في برامج تطوير الحوامض من الوسائل الواعدة للمساهمة في إيجاد حلول مناسبة لهذه المشاكل. و يعتبر اختيار وسط غذائي مناسب من الحلقات المهمة في مسلسل إنتاج النباتات. هذا و تهدف هذه الدراسة إلى إيجاد محلول غذائي مناسب لنمو الكالس لدى بعض حاملي طعم الحمضيات. و لقد تمت مقارنة ثلاثة أوساط غذائية تشمل محلول "موراشيك و سكوك" زيادة على محلولين معدلين انطلاقاً من هذا الأخير. كما تمت مقارنة تركيزين من "الأوكسين 2,4-D".

ولقد أظهرت النتائج المحصل عليها أن محلول "موراشيك و سكوك" المعدل بإضافة فيتامينات "موراشيك و توكو (1969)" و المحتوي على 0.4 ملغ/لتر من الأوكسين 2,4-D يمكن من الحصول على أحسن النتائج فيما يخص نمو وتطور "الكالس" مقارنة مع التركيبات الأخرى. كما مكنت الدراسة من اعتماد مساحة "الكالس" كطريقة سهلة لاستخلاص الوزن الرطب وكذا الجاف للكالس."

الكلمات المفتاحية : الحمضيات، حامل الطعم، المحلول الغذائي، الأوكسين، زراعة الأنسجة

Introduction

Le secteur agrumicole marocain joue un rôle socio-économique de premier choix et se classe parmi les branches les plus importantes de l'économie nationale (Anonyme, 1998). Au niveau de la région méditerranéenne, près de 95% des plantations d'agrumes sont encore greffées sur le bigaradier. Ce dernier est classé dans le groupe des porte-greffes dont la tolérance à la salinité est moyenne (Bernstein, 1969) et présente l'inconvénient d'être sensible à la tristeza. Aussi, le *Poncirus trifoliata* et certains de ses hybrides avec les Citrus qui tolèrent la tristeza sont malheureusement sensibles à la salinité (Zecri et Parsons, 1989). La recherche de nouveaux porte-greffes qui permettraient, entre autres, une meilleure adaptation aux conditions du milieu (salinité, calcaire, etc.) et une résistance aux maladies (tristeza, etc.) est une des priorités de recherches en cours au niveau des principaux pays agrumicoles (Aubert, 1994 ; Ollittraut, 1998). Il est à noter que tous les périmètres irrigués au Maroc sont affectés par la salinité et le pourcentage de sols touchés a atteint 63% des terrains du Gharb (soit plus de 40000 ha) et 71% des sols de Tafilalet (soit plus de 14 000 Ha) (Ftouhi, 1981). L'application des techniques de culture in vitro est une approche qui permet l'obtention de variants somaclonaux chez de nombreuses espèces (Gautheret, 1985), entre autres chez les agrumes (Gmitter et al., 1992). Cette approche a été adoptée chez les agrumes par de nombreux auteurs (Beloualy, 1991 ; Chakravarty, 1999 ; Bouharmont et al., 1993; Ollittraut, 1992). Les cals sont aussi exploités, chez les agrumes, dans les travaux d'hybridation somatique (Ollittraut et al., 1994) et de transformation génétique (Hidaka et al., 1990). Dans notre laboratoire, les cals sont actuellement utilisés pour la recherche de variants somaclonaux de porte-greffe tolérants à la salinité. La callogenèse chez les agrumes est influencée, entre autres, par la composition du milieu de culture (Randall, 1994) et par les régulateurs de croissance (Beloualy, 1991). La production de cals a ainsi été obtenue en utilisant MS (Kochba et Spiegel-Roy, 1973) et d'autres formulations issues de modifications de ce dernier. Alors que certains auteurs ont trouvé que la modification de la composition de MS ne semble pas nécessaire pour les Citrus (Button et Kochba, 1977) d'autres ont à l'encontre trouvé que des modifications de MS, notamment le milieu MT développé par Murashige et Tucker (1969) donnent de meilleurs résultats chez les agrumes. Concernant les régulateurs de croissance, le 2,4-D est l'auxine qui a donné les meilleurs résultats de callogenèse chez les Citrus (Murashige et Tucker (1969). Aussi, l'ad-

position du milieu MS est bénéfique uniquement dans le cas de *C. aurantium*. Ceci traduirait des exigences spécifiques de ce porte-greffe. Les travaux réalisés chez les agrumes ont d'ailleurs montré que la réponse aux modifications du milieu de culture dépend du génotype (Gmitter et al., 1992) ; et l'importance du facteur génétique est aussi confirmé chez de nombreuses plantes (George et Sherrington, 1984).

Développement des cals

Le développement des cals a aussi été affecté par le milieu de culture et la concentration de 2,4-D utilisée. L'interaction entre ces deux facteurs est très hautement significative dans le cas de la surface des cals de *P. trifoliata* et significative dans le cas de *C. aurantium*. Les meilleurs résultats ont été obtenus dans le milieu MST additionné de 0.4 mg/l de 2,4-D (Tableaux 1 et 2)

Tableau 2. Effet de l'interaction du milieu et de 2,4-D sur l'induction des cals de *P. trifoliata* et de *C. aurantium* après quatre semaines de culture.

| | | % Induction des cals | Surface (mm ²) |
|-------|-------|----------------------|----------------------------|
| MS | - 0.2 | 70 c | 10.5 b |
| | - 0.4 | 79 b | 9.3 b |
| 1/2MS | - 0.2 | 100 a | 4.1 c |
| | - 0.4 | 90 b | 4.0 c |
| MST | - 0.2 | 95 b | 10.5 b |
| | - 0.4 | 100 a | 14.3 a |
| Seuil | | * | * |

Concernant les autres paramètres mesurés (hauteur, poids frais et poids sec), on a assisté à une amélioration du développement des cals au cours des subcultures (8 et 12 semaines) avec une supériorité notable du milieu MST pour les deux porte-greffes (Tableaux 3 et 4) ; la différence entre les milieux de culture étant hautement significative. D'autres auteurs ont aussi trouvé que l'addition d'une cytokinine au 2,4-D favorise le développement des cals de Citrus (Belkoura, 1987 ; Beloualy, 1991 ; Taoudi, 1994). Egalement, l'effet bénéfique des subcultures sur le développement des cals a été rapporté chez plusieurs espèces (Abousalim & Hafdi, 1995).

Tableau 3. Effets du milieu de culture sur le développement des cals de *P. trifoliata* (initiés en présence de 0.4 mg/l de 2,4-D) après 8 et 12 semaines de culture.

| Semaines | Hauteur (mm) | | PF (mg) | | PS (mg) | |
|----------|--------------|--------|---------|----------|---------|---------|
| | 8 | 12 | 8 | 12 | 8 | 12 |
| MS | 2.7 | 3.2 b | 62.65 | 77.82 b | 12.55 | 15.11 b |
| 1/2MS | 2.6 | 3.4 b | 57.00 | 61.00 b | 10.25 | 12.75 b |
| MST | 3.15 | 5.25 a | 80.80 | 116.21 a | 14.89 | 21.17 a |
| Seuil | ** | ** | ** | ** | ** | ** |

PF : poids frais ; PS : poids sec.

Tableau 4. Effets du milieu de culture sur le développement des cals de *C. aurantium* (initiés en présence de 0.4 mg/l de 2,4-D) après 8 et 12 semaines de culture.

| Semaines | Hauteur (mm) | | | PF (mg) | | | PS (mg) | | |
|----------|--------------|-----|---|---------|--------|---|---------|-------|---|
| | 8 | 12 | | 8 | 12 | | 8 | 12 | |
| MS | 3.0 | 3.4 | b | 46.73 | 61.07 | b | 12.55 | 15.12 | b |
| 1/2MS | 3.3 | 3.1 | b | 52.4 | 63.40 | b | 11.40 | 12.60 | b |
| MST | 3.9 | 4.6 | a | 62.8 | 128.55 | a | 14.9 | 20.18 | a |
| Scuil | ** | | | *** | | | ** | | |

PF : poids frais ; PS : poids sec.

Concernant le milieu MST, bien qu'il s'est distingué seulement dans le cas de *P. trifoliata* en phase d'induction, ce milieu a favorisé la meilleure croissance des cals des deux porte-greffes en phase de développement. Cette différence de comportement dans le cas de *C. aurantium* peut traduire des exigences nutritionnelles différentes selon le stade de culture; ce porte-greffe ayant donné de meilleurs résultats en présence de 1/2MS, en phase d'induction. A ce stade de culture, la présence de concentrations élevées en macroéléments semble être défavorable à l'induction des cals. La supériorité du milieu MST, en phase de développement, peut être attribuée à sa composition vitaminique particulière. En effet, les concentrations de thiamine-HCl, de pyridoxine-HCl et de l'acide nicotinique ont été augmentées, respectivement, à 10, 10 et 5 mg/l, soit 100, 20 et 10 fois plus que dans les autres milieux testés. Parmi les quatre principales vitamines généralement utilisées, seule la thiamine a été démontrée nécessaire dans le cas des cultures en suspension de soja (Gamborg et al. 1968). Certains auteurs ont d'ailleurs suggéré de modifier la composition vitaminique de MS en augmentant légèrement la concentration de thiamine à 0.4 mg/l (Linsmaier et Skoog, 1965). Aussi, cette vitamine a été utilisée seule dans le cas des cultures en suspension du riz (Ohira et al., 1973).

Il est à noter que de très bonnes corrélations existent entre le PF et le PS des cals, d'une part, et les autres paramètres mesurés (longueur, largeur, hauteur, et surtout la surface), d'autre part (Tableau 5). Ainsi, la surface des cals peut être exploitée pour estimer leurs PF et PS de façon fiable; cette dernière étant destructive et la mesure du PF est laborieuse et présente en plus le risque de contamination pouvant survenir lors de la réalisation des pesées.

Tableau 5. Coefficients de corrélations entre les différents paramètres quantitatifs des cals développés, après 12 semaines de culture sur le milieu MST

| | <i>P. trifoliata</i> | | <i>C. aurantium</i> | |
|----------|----------------------|------|---------------------|------|
| | PF | PS | PF | PS |
| Longueur | 0.86 | 0.87 | 0.75 | 0.80 |
| Largeur | 0.82 | 0.83 | 0.87 | 0.88 |
| Hauteur | 0.85 | 0.83 | 0.9 | 0.80 |
| Surface | 0.95 | 0.92 | 0.88 | 0.93 |

PF : poids frais; PS : poids sec

Il est à signaler qu'à la fin de la troisième subculture, les cals sont surtout de texture friable (70%), de couleur blanc-crème ou blanc-translucide. Ce sont les cals compacts, représentant 30% des cals développés, qui ont manifesté une activité organogène avec le développement