

Recherche de la variation somaclonale pour l'induction de la tolérance au stress salin de lignées cellulaires de porte-greffes d'agrumes

*Ramdan R.^{a/b}, Handaji N.^a, Arsalane N.^a, Ait Haddou M.^a,
Ben Yahia H.^a, Affelah M.^a et Chlyah H.^b*

*a - INRA CRRA Rendre Laboratoire d'amélioration génétique, UR/ ACR-
PHG, Kénitra, Maroc*

b - Université Mohamed -Faculté des Sciences, V, Rabat, Maroc

Résumé

La présente étude vise l'induction de la variation somaclonale via la callogénèse pour la sélection in vitro de lignées cellulaires tolérants à la salinité de cinq porte-greffes d'agrumes (*Poncirus trifoliata*, *Citrus aurantium*, *Citrus volkamériana*, mandarinier Cléopâtre et le lime rangpur). Les cals ont été induits à partir d'embryons excisés et cultivés sur le milieu de Murashige et Tucker (1969) contenant 1mgL^{-1} de 2,4-D et $0,5\text{mgL}^{-1}$ de BAP. Deux méthodes d'induction de la résistance à la salinité ont été réalisées, la première se base sur la culture d'embryons oulet des cals sous stress appliqué de façon directe (0 gL^{-1} , 3 gL^{-1} , 6 gL^{-1} , 8 gL^{-1} , 9 gL^{-1} et 10 gL^{-1} de NaCl); La deuxième méthode se base sur la culture des cals sous stress appliqué graduellement.

Les résultats ont prouvé que la mandarine Cléopâtre présente la meilleure aptitude à la callogénèse en présence de sel et pour les différentes concentrations avec une moyenne de 73%. Il y a une amélioration de la résistance à la salinité par le test de stress graduel pour le *P. trifoliata* et le *C. aurantium* et même pour les porte-greffes considérés résistants à la salinité le mandarinier Cléopâtre et la lime rangpur. En effet, les cals sélectionnés en condition de stress salin graduel, montrent un développement normal jusqu'à 9 gL^{-1} de NaCl pour le *C. aurantium* et le *P. trifoliata* et jusqu'à 10 gL^{-1} pour le mandarinier Cléopâtre et le lime rangpur. Une nécrose totale des cals a été observée à la dose de 11 gL^{-1} de NaCl. Les cals de *C. volkamériana* ont exprimé une tolérance à 9 gL^{-1} de NaCl et une tolérance relative à 10 gL^{-1} de NaCl. *C. volkamériana* présente ainsi une tolérance intermédiaire aux sels par rapport aux autres porte-greffes.

Mots-clés : Agrumes, porte greffes, salinité, variations somaclonales,

البحث عن التغيير السوماكلوني من أجل انتقاء حاملي شتلات الحوامض مقاومة للملوحة

رمضان ر.، هنداجي ن.، أرسلان ن.، أيت حدوم.، بن يحيى ح.، أفلاح م.، اشلياح ح.

ملخص

اتبعت في هذه الدراسة طريقتان لتجربة تحمل الملوحة: الطريقة الأولى وهي تجربة مباشرة تعتمد على زرع الجنين أو/ و"الكال" تحت ضغط ملوحي مسلط بشكل مباشر (0، 3، 6، 8، 9، 10، 11) و ل/ غ. الطريقة الثانية هي تجربة تعتمد على زراعة "الكال" تحت ضغط ملوحي مطبق بطريقة تدرجية.

أظهرت النتائج أن (المونداغيني كليباطغ *mandarinier Cléopâtre*) تمثل أحسن قابلية للكالوجينيز *collogenèse* بحضور الملوحة بمعدل، 73% وأن هناك تحسن المقاومة للملوحة بطريقة الضغط الملوحي المتدرج وذلك لكل من "البيكارادي" و"البونسغوس طغيفلياطا". هذا التحسن لوحظ حتى عند "المونداغيني كليباطغ" و"ليم رونغبوغ" المعتبرين مقاومين للملوحة.

أظهرت "الكال" المنتقاة في ظروف الضغط الملوحي المتدرج تطور عادي حتى نسبة ل/ غ 9 من ملح NaCl لكل من "البيكارادي" و"البونسغوس طغيفلياطا"، وحتى نسبة ل/ غ 10 من ملح NaCl لكل من "المونداغيني كليباطغ" و"ليم رونغبوغ"، غير أن مقدار ل/ غ 11 من ملح NaCl تسبب في موت كل "الكال".

الكلمات المفتاح: الحوامض، حاملي الشتلات، الملوحة، التغيير السوماكلوني *Somaclonal*، الكالوجينيز *Callogenèse*.

callogenèse Search of somaclonal variation for tolerance induction of salt stress at citrus rootstock cellular lines

Summary

This study was undertaken to induce somaclonal variation via callogenesis in order to select resistant genotypes to salinity of five citrus rootstocks (Poncirus trifoliata, Citrus aurantium, C. volkamériana mandarinier Cléopâtre and lime rangpur). Callogenesis was initiated after in vitro culture of excized embryos on MT medium with 1mgL^{-1} of 2,4-D and $0,5\text{mgL}^{-1}$ BAP.

Two procedures for salt resistance were made: the first was based on direct exposure of excised embryos or callus to different concentration of NaCl (0 gL^{-1} , 3 gL^{-1} , 6 gL^{-1} , 8 gL^{-1} , 9 gL^{-1} et 10 gL^{-1}). The second, callus was placed in vitro culture on media containing gradually increasing quantities of NaCl.

The results showed that mandarinier Cleopatre has the best capacity for callogenesis in NaCl media with an average of 73%. Also, gradual test allowed an amelioration of salinity resistance with a normal callus development up to 9 gL^{-1} of NaCl for P. trifoliata and C. aurantium and up to 10 gL^{-1} of NaCl for mandarinier Cleopatre and lime rangpur. The callus of C. volkameriana expressed a tolerance with 9 gL^{-1} of NaCl and a relative tolerance with 10 gL^{-1} of NaCl. Thus we can say that C. volkameriana is intermediate salt-tolerant rootstock.

Key words : Citrus fruits, rootstocks, salinity, somaclonal variation, callogenesis

I- Introduction

Les agrumes sont parmi les arbres fruitiers les plus exigeants en eau dans les périodes sèches. Cependant, l'irrigation mal maîtrisée ou à base d'eaux saumâtre entraîne chaque année un déclin significatif du rendement (Zid *et al.* 1991; Gupta 1997; Cirad, 1998).

Au Maroc, l'agrumiculture se développe intensivement dans les zones irriguées avec une production ciblée sur les petits agrumes destinés à la consommation en frais. Cependant, 90% des plantations sont réalisées sur le bigaradier sensible à la salinité. De ce fait, l'INRA a entrepris un programme de recherche sur la création et la sélection de nouveaux porte-greffes tolérants à la salinité. Plusieurs méthodes d'amélioration génétique des agrumes ont été explorées à l'échelle internationale. Des croisements ont été faits entre des porte-greffes pour la production d'hybrides tolérants (Ollitrault 1995; Jacquemond *et al.* 2002; Ezzoubir, 2002), mais cette méthode reste longue et difficile, en raison de la durée du cycle de reproduction et de l'éloignement systématique des formes tolérantes. De ce fait, la variation somaclonale est une voie prometteuse pour l'amélioration. Ainsi, la régénération *in vitro* des plantes à partir de cals provenant de différents tissus et cultivés sous des conditions salines a donné des résultats pertinents (Beloualy *et al.* 1993; Maas, 1993 ; Garcia et Primo, 1995; Kochba *et al.*, 1982). Des plantes entières ont été régénérées à partir de lignées cellulaires sélectionnées pour leur résistance à la salinité. En plus, la transmission de ce caractère aux descendances a été démontrée par Nabors *et al.*, 1980 et Collin *et al.*, 1990. Par conséquent, les souches cellulaires sont libérées des contraintes physiologiques, rencontrées dans la plante, *in situ*. Cette voie associée à l'effet d'agents stressants, permettrait d'agir sur des systèmes génétiques différents de la sélection classique (Sibi 1989; Sibi 1996; Gmitter. *et al.* 1992). Par ailleurs, un stress appliqué de façon directe sera une source d'un criblage de simples mutations, faciles à reverser, alors qu'une pression appliquée graduellement devrait entraîner une adaptation (Sibi *et al.* 2000).

Le présent travail vise l'induction de la variation somaclonale pour la sélection *in vitro* de lignées cellulaires tolérantes à la salinité à partir de cals issus de la culture *in vitro* des embryons de cinq porte-greffes d'agrumes. Ainsi de comparer deux voies de sélection *in vitro* de callogenèse: la culture des embryons ou/et des cals sous stress appliqué de façon directe et la culture des cals sous stress appliqué graduellement. C'est ainsi que l'adjonction au milieu de culture, de stress salin, en quantité sub-létale et dont les doses augmentent à chaque repiquage des cals, devrait éliminer progressivement toute cellule inadaptée, tandis que les autres se multiplient. Il en résulte des souches résistantes ou tolérantes à un stress de forte intensité (Sibi 2000).

Des analyses de la variance selon la méthode de Newman-Keuls, pour les caractères: Taux d'induction callogène (TIC) et le nombre de jours pour l'initiation de la callogenèse (NJC) ont été effectuées.

II- Matériel et Méthodes

Pour mener cette étude, les cinq espèces de porte-greffes suivants issus de la collection de l'INRA (Maroc) ont été retenues: *Poncirus trifoliata*, *Citrus aurantium* (Bigaradier), *Citrus volkamériana*, mandarinier Cléopâtre et lime rangpur (Tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques des porte greffes étudiés

Porte Greffe	Caractéristiques
<i>Poncirus trifoliata</i>	porte-greffe d'avenir possède un locus de résistance à la tristéza. Sensible à l'exocortis, mais fortement résistant aux nématodes, au xyloporose et au phytophthora. Il confère au greffon une meilleure résistance au froid et au gel. Fortement fructueuse. Mais sa très faible tolérance à la salinité mérite d'être pris au sérieux dans les programmes d'amélioration.
<i>Citrus aurantium</i>	porte-greffe le plus utilisé au Maroc en vertu de son adaptation aux conditions pédo-climatiques des régions agrumicoles de ce pays. Cependant, sa sensibilité à la tristéza et sa faible tolérance à la salinité rendent les travaux de sélection plus que jamais d'actualité (Forner ,1979 cité par Bougerfaoui, 1987).
<i>Citrus volkamériana</i>	porte-greffe très vigoureux, résistant aux principaux maladies qui attaquent les agrumes; il a une tolérance modérée vis à vis de la salinité (Zekri, 2002). Plusieurs variétés greffées sur ce porte-greffe présentent une bonne productivité.
Mandarinier Cléopâtre	Est après le Bigaradier le porte-greffe à choisir du fait de sa tolérance à la tristéza, l'exocortis et la psoriasis et aussi de sa résistance à la salinité. Il présente une bonne résistance à la chlorose ferrique, mais assez sensible à l'asphyxie racinaire. Plusieurs variétés greffées sur ce porte-greffe présentent une bonne productivité et une qualité du fruit appréciable.
Lime rangpur	Porte-greffe intéressant du fait de sa tolérance au froid et au gel et à la salinité. Mais il est sujette fortement à la croûte; sensible aux: exocortis, xyloporosis, phytophthora et tristéza. Ce qui limite son utilisation comme porte-greffe (Forner, 1979 cité par Bougerfaoui ,1987).

Les fruits de chaque porte-greffe sont récoltés au stade de maturité. Les pépins sont extraits puis désinfectés par l'eau de javel à 5% et de l'alcool à 70%. Les embryons sont ensuite excisés dans des conditions aseptiques et mis dans un milieu de culture approprié pour l'induction de la callogenèse dont le milieu de base est celui de Murachige et Tucker (1969). Ce milieu est complété par 50g de saccharose, 500mg d'extrait de malt, 1mgL^{-1} d'acide 2,4-dichlorophenoxy acétique (2,4-D) et $0,5\text{mgL}^{-1}$ de benzyl amino purine (BAP). Le pH est ajusté à 5,7. La callogenèse est initiée à l'obscurité à $26\pm 1^\circ\text{C}$, et la multiplication des cals se fait par le repiquage dans le même milieu une fois tous les mois durant toute l'expérimentation.

Pour la sélection *in vitro* de lignées tolérantes à la salinité, deux voies ont été mises en évidence:

- La mise en culture des embryons ou/et des cals sous stress appliqué de façon directe (Figure 1A et 1C) à raison de 5 embryons (ou cals) par boîte de pétri. La multiplication des cals obtenus se fait dans le même milieu avec la même concentration saline.

- La culture des cals avec repiquage sur des milieux de plus en plus concentrés en NaCl (Figure 1B). Le transfert des cals d'une concentration de NaCl à l'autre se fait après un mois de mise en culture.

Les doses de NaCl choisies pour la sélection de la tolérance sont les suivantes : S0=0 gL^{-1} de NaCl, S3=3 gL^{-1} , S6=6 gL^{-1} , S8=8 gL^{-1} , S9=9 gL^{-1} , S10=10 gL^{-1} et S11=11 gL^{-1} de NaCl. Ces concentrations sont choisies pour pouvoir discriminer les porte-greffes entre eux. Chaque traitement est répété cinq fois.

Les paramètres étudiés sont: le taux d'induction des cals (TIC), le nombre de jours pour l'initiation de la callogenèse (NJC) et le développement des cals (DC). Les résultats sont soumis à l'analyse de la variance à un ou à deux facteurs et les moyennes sont comparées selon la méthode de Newman-Keuls, basée sur la plus petite amplitude significative. Chaque moyenne est affectée d'une lettre, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité de 5%.

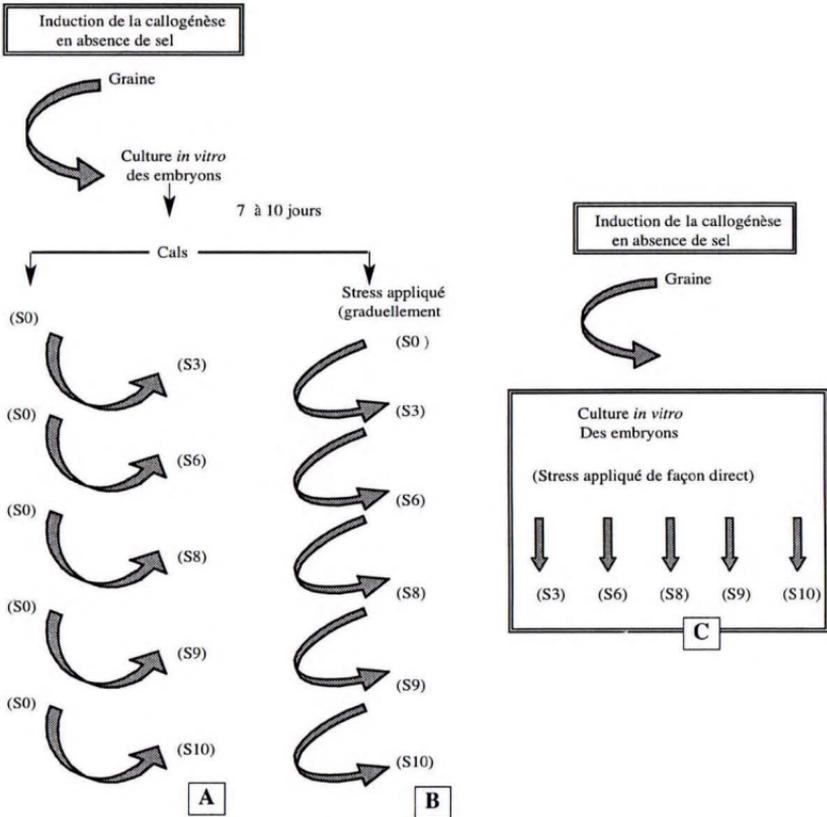


Figure 1 : Schéma général de la sélection de la tolérance à la salinité :

A et C - Culture *in vitro* des embryons et /ou des cals sous stress salin directe

B- culture *in vitro* des cals sous stress salin graduel

S0 = 0 gL⁻¹ de NaCl, S3=3 gL⁻¹, S6=6 gL⁻¹, S8=8 gL⁻¹, S9=9 gL⁻¹ et S10=10 gL⁻¹.

↪ : Repiquage des cals

Résultats

1- Effet du stress salin directe

a/ Induction des cals

Au delà de 7 à 25 jours d'incubation, et en fonction des doses de NaCl utilisées, des cals blanchâtres apparaissent à la surface des explants, ces cals grossissent et leurs aspects varient avec la dose de NaCl. L'analyse de la variance sur le pourcentage d'induction des cals a montré qu'il existe une différence significative entre les porte-greffes et qu'il n'y a pas une interaction entre l'effet génotype et l'effet dose de NaCl avec l'existence d'une différence très hautement significative entre les cinq traitements relatifs aux différentes doses de NaCl (Tableau 2).

Tableau 2 . Résultat de l'analyse de la variance effectuée sur le taux d'induction callogène de cinq porte-greffes d'agrumes sous stress salin avec différentes doses de 0 à 9 gL⁻¹ de NaCl.

	Source de variation	F observée	Pr > F
Porte-greffe	(PG)	4,75	0,0042 **
Dose de NaCl	(DS)	53,82	0,0001 ***
PG X DS		0,91 ns	0,53 (ns)

** hautement significatif; *** très hautement significatif; ns : non significatif. Seuil 5%

Les résultats des analyses statistiques ont permis aussi de regrouper les porte-greffes en trois groupes homogènes :

- Le groupe 1 contient le *P. trifoliata* et le *C. aurantium* : la concentration de 3 gL⁻¹ de NaCl n'a pas un effet inhibiteur sur l'induction de cals, ce taux est resté plus ou moins égal à celui du témoin. Par contre, les concentrations allant de 6 gL⁻¹ à 8 gL⁻¹ réduisent fortement ce taux. Pour des concentrations de 9 gL⁻¹ et 10 gL⁻¹, l'induction de la callogénèse est inhibée et la plupart des embryons mis en culture sont nécrosés.

- Le groupe2 inclus le mandarinier Cléopâtre et la lime rangpur: une forte réduction de l'induction du callogénèse à partir de 9 gL⁻¹ du NaCl a été mise en évidence. En revanche, des concentrations de NaCl allant jusqu'à 6 gL⁻¹ n'ont révélé aucun effet significatif sur le taux d'induction callogène. Ce dernier est resté plus ou moins égal à celui du témoin. Une légère diminution de ce taux a été observée sur le milieu contenant 8 gL⁻¹ de NaCl. Le mandarinier Cléopâtre a montré la meilleure aptitude à la callogénèse pour différentes concentrations en NaCl (Figure 2 et Tableau 3) avec une moyenne de 73,4%. Ceci confirme les résultats trouvés par Caste *et al* (1993) et Spiegel-Roy (1996).

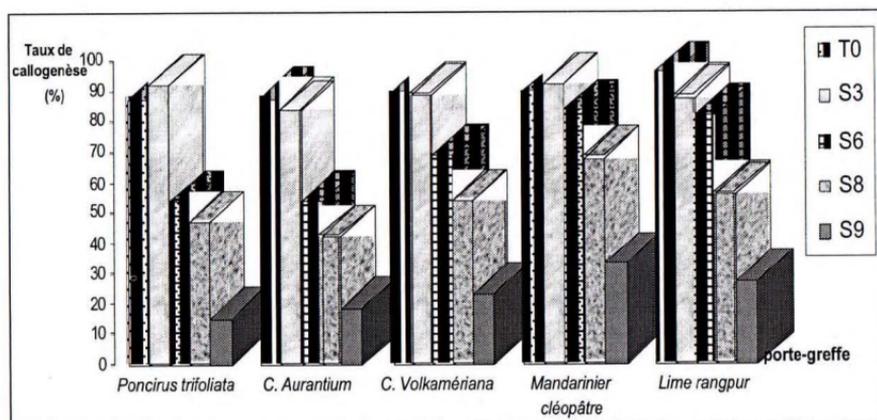


Figure 2 : Variation du taux d'induction callogène chez les cinq porte-greffes en fonction des traitements salin

S0 = 0 g/l de NaCl, S3 = 3g/l de NaCl,
S6 = 6g/l de NaCl, S8 = 8g/l de NaCl

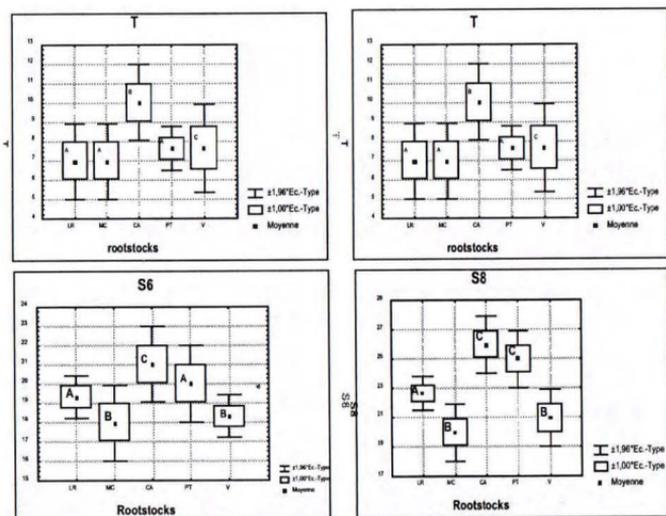


Figure 3 : Représentation graphique de l'analyse statistique effectuée pour démontrer l'interaction entre les porte-greffes et les différents traitements salin concernant le nombre de jours pour l'initiation de la callogenèse.

PT = *Poncirus trifoliata*, CA = *C. Aurantium*, MC = Mandarinier cléopâtre, LR = Lime rangpur, V = *C. Volkamériana*

Tableau 3 . Taux d'induction callogène (%) en fonction des traitements salins.

	S0	S3	S6	S8	S9	Moyenne
<i>Poncirus trifoliata</i>		88	92	54	4715	59,2 a
<i>Citrus aurantium</i>		88	84	54	4219	57,4 a
<i>Citrus volkamériana</i>	90	89	69	54	23	65 b
mandarinier Cléopâtre	90	92	84	68	33	73,4 c
lime rangpur	96	88	82	56	27	69,8 c
Moyenne	90,5 d	89 d	69 e	53,25 f	23,4 g	64,96

S0 = 0 gL⁻¹, S3 = 3 gL⁻¹ de NaCl, S6 = 6 gL⁻¹ de NaCl, S8 = 8 gL⁻¹ de NaCl,

S9 = 9 gL⁻¹ de NaCl

- le groupe 3 avec le *C. volkamériana*: Les cals ont exprimé une tolérance à 6 gL⁻¹ de NaCl et une tolérance relative à 8 gL⁻¹ de NaCl; Ainsi, *C. volkamériana* présente une tolérance intermédiaire aux sels par rapport aux autres porte-greffes.

Aussi, l'analyse de la variance au seuil de probabilité de 5% et le test statistique de Dunnett ont révélé une différence significative entre les traitements salins (S6, S8, S9) et le témoin, avec l'existence de quatre groupes homogènes: (S0 et S3); (S6); (S8); (S9) (Tableau 4).

De plus, l'addition de NaCl au milieu de culture a retardé l'initiation de la callogenèse pour les cinq porte-greffes. Ce retard diffère d'un porte-greffe à l'autre, ce qui montre la tendance non conforme parmi les porte-greffes d'agrumes concernant le nombre de jours pour l'initiation de la callogenèse (Figure 3).

b/ Développement des cals (Figure 4) :

Pour éviter tout problème de contamination, le développement des cals a été évalué à partir de la texture, de la coloration et de l'augmentation du volume des cals. Le test d'exposition directe des cals des cinq porte-greffes aux différentes doses de NaCl testés a donné diverses réponses dans les 7 à 25 jours de mise en culture: des cals transparents, friables et non embryogènes ont été produits et développés sur le milieu de culture contenant des concentrations en NaCl allant jusqu'à 6 gL⁻¹ pour le *P. trifoliata* et *C. aurantium* et jusqu'à 8 gL⁻¹ de NaCl pour le mandarinier Cléopâtre et le Lime rangpur. Pour le *C. volkamériana*, ce test a montré que c'est un porte-greffe intermédiaire pour sa tolérance aux sels puisque les cals ont exprimé une tolérance relative avec 8 gL⁻¹ de NaCl, ce résultat a été confirmé *in vivo* par Zekri (2002).

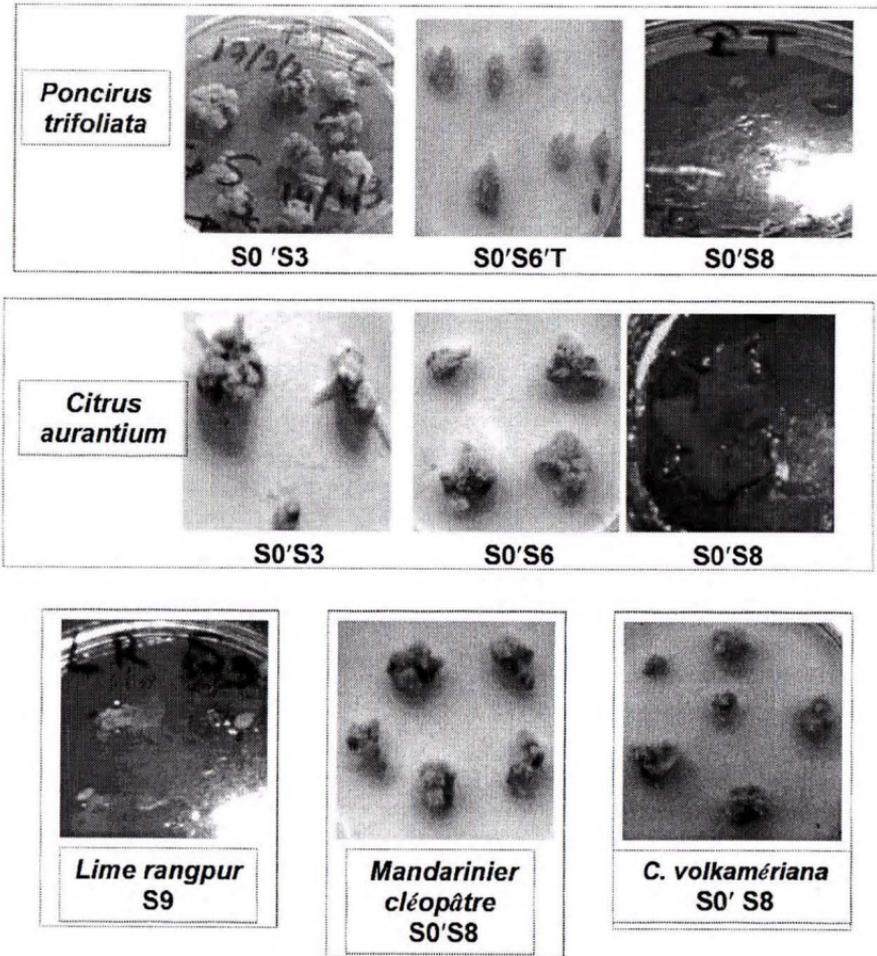


Figure 4 : Les cals induits après repiquage des embryons sur des milieux contenant différents dose de sel

S0 = 0 g/l de NaCl, S3 = 3g/l de NaCl,

S6 = 6g/l de NaCl, S8 = 8g/l de NaCl

Une forte concentration (10 gL^{-1} de NaCl) entraînent une déshydratation et une nécrose des cals, et ne permet pas une reprise de croissance après leur repiquage sur des milieux contenant des doses inférieures de NaCl, ce qui confirme la mort cellulaire.

2- Effet du stress salin graduel sur le développement des cals (Figure 5) :

Les cals sélectionnés en condition de stress salin graduel, montrent un développement normal jusqu'à 9 gL^{-1} de NaCl pour *C. aurantium* et *P. trifoliata* et jusqu'à 10 gL^{-1} pour mandarinier Cléopâtre, lime rangpur et *C. volkamériana*. Ces cals non embryogènes sont restés friables, transparents, pâteux. Une nécrose totale du matériel végétal a été enregistrée à la dose de 11 gL^{-1} de NaCl.

Les lignées cellulaires résistantes à 9 gL^{-1} et à 10 gL^{-1} de NaCl ont ensuite été multipliées *in vitro* pendant 4 mois sur les mêmes milieux salins, où leur croissance est restée normale. Les sous cultures provenant des cals sélectionnées ont été transférées pendant trois mois sur des milieux sans sel. La moitié des cals ont montré une croissance réduite ou une nécrose plus ou moins rapide. Ces irrégularités peuvent être dues à des mutations ou autres modifications survenues au cours des cultures antérieures. Seules les lignées qui ont continué leur croissance ont été conservées pour des études ultérieures basées sur les analyses biochimiques. Après la mise en culture des cals sur les milieux contenant 9 gL^{-1} et 10 gL^{-1} de NaCl respectivement pour le groupe *C. aurantium* et *P. trifoliata* et le groupe mandarinier Cléopâtre, lime rangpur et *C. volkamériana*, leur croissance n'a pas été affectée, confirmant la stabilité du caractère sélectionné antérieurement. Concernant les cals témoins leur croissance décroît rapidement dès les plus faibles concentrations en sel. Le repiquage de cals primaires non embryogènes des cinq porte-greffes, même sur un milieu très favorable, conduit toujours à une callogenèse abondante sans aucune manifestation morphogénétique

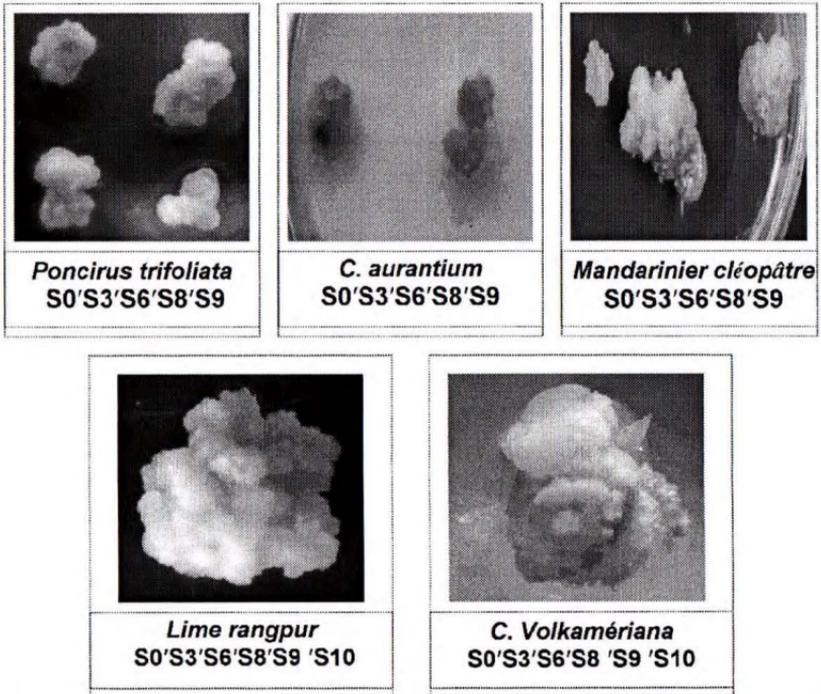


Figure 5. Les cals induits après repiquage des embryons sur des milieux contenant différents dose de sel

S0 = 0 g/l de NaCl, S3 = 3g/l de NaCl,

S6 = 6g/l de NaCl, S8 = 8g/l de NaCl

Tableau 4 . Comparaison entre la capacité de callogénèse sous stress salin progressif et sous stress salin directe .

	Capacité de croissance et de multiplication	Dose létale de NaCl	% des cals obtenues	
			<i>Citrus aurantium</i>	<i>Poncirus trifoliata</i>
Stress progressif	Normale jusqu'à 9gL ⁻¹ de NaCl	10 gL ⁻¹	15% des cals résistants à 10 gL ⁻¹ de NaCl	16% des cals résistants à 10 gL ⁻¹ de NaCl
Stress directe	Normale jusqu'à 6gL ⁻¹ de NaCl	9 gL ⁻¹	18% des cals résistants à 8 gL ⁻¹ de NaCl	16% des cals résistants à 8 gL ⁻¹ de NaCl
	Capacité de croissance et de multiplication	Dose létale de NaCl	% des cals obtenues	
			Mandarinier	Cléopâtre / Lime rangpur
Stress progressif	Normale jusqu'à 10gL ⁻¹ de NaCl	11 gL ⁻¹	17% des cals résistants à 11 gL ⁻¹ de NaCl	14% des cals résistants à 11 gL ⁻¹ de NaCl
Stress directe	Normale jusqu'à 8gL ⁻¹ de NaCl	10 gL ⁻¹	30% des cals résistants à 9 gL ⁻¹ de NaCl	26% des cals résistants à 9 gL ⁻¹ de NaCl

Discussion et Conclusions

Les résultats de nombreux travaux ont montré que les techniques de culture *in vitro* sont les plus adéquates pour la sélection de lignées cellulaires tolérantes à la salinité (Zenk, 1974; Dix, 1980; Kochba *et al.*, 1982). Les variants sélectionnés à ce jour pour la tolérance à la salinité ont été obtenus par des méthodes de sélection fondées sur la mise en œuvre d'une pression sélective inhibant la croissance en éliminant les cellules sensibles (Maliga, 1984). La pression sélective est obtenue en supplémentant le milieu de culture avec différentes concentrations en sel. Les cellules tolérantes, identifiées par leur croissance ou leur survie en présence du sel, sont transférées sur un milieu de régénération additionné ou non en sel.

Les résultats de notre étude nous permettent de choisir la voie optimale pour l'obtention des lignées cellulaires tolérantes ou résistantes à un stress salin de forte intensité. De nombreuses études ont été réalisées à partir de culture cellulaire sous stress salin appliqué de façon directe (Kochba *et al* 1982 cité par Mademba-Sy 1998; Beloualy *et al* 1993; Bouharmont 1994). Mais cette voie reste à faible importance puisque la mutation induite par ce stress reste simple, facile à reverser, alors qu'une pression appliquée graduellement devrait entraîner une adaptation, faisant appel à une multiplicité de récep-

teurs biologiques aux bases génétiques diversifiées. Sibi (2000) a constaté que l'application, simultanée, des pressions stressantes, telle l'adjonction progressive de chlorure de sodium, devrait pouvoir diriger la variation de façon spécifique et permettre d'améliorer les potentialités de tolérance.

Selon Beloualy *et al* (1993), la sélection de cellules tolérantes à la salinité par culture *in vitro* suppose que des mutants somaclonaux étaient présents. C'est ainsi que l'adjonction au milieu de culture, de sel, dont les doses augmentent à chaque repiquage des cals, devrait éliminer progressivement toute cellule inadaptée ou en bloquer la division, tandis que les autres se multiplient; ceci aboutissant à des souches tolérantes à un stress de forte intensité (Sibi 1996 ; Meredith, 1984; Mc Hughen et Swartz, 1984; Mc Hughen, 1987).

Les résultats de la présente étude confirment ces constatations: Des lignées cellulaires tolérantes ont été obtenues à une concentration de 9 gL⁻¹ de NaCl pour le *C. aurantium* et *P. trifoliata* et de 10 gL⁻¹ pour le mandarinier Cléopâtre et le lime rangpur. Pour les lignées cellulaires non sélectionnées, la croissance décroît rapidement dans le milieu contenant les faibles concentrations en NaCl et un brunissement des cals apparaît avec les fortes concentrations. Le brunissement résulte d'une mise en contact des systèmes oxydatifs, essentiellement cytoplasmiques, et de leurs substrats, plutôt vacuolaires (Mayer et Harel, 1981). Ce phénomène implique une décompartmentation cellulaire consécutive à des traumatismes mécaniques (coupes, blessures,...), à la sénescence des tissus ou à une dégradation accidentelle des membranes par des formes toxiques d'oxygène. Ce brunissement est lié essentiellement aux systèmes enzymatiques classiquement impliqués dans l'oxydation des composés phénoliques. En effet, les recherches menées dans ce sens sur *Hevea brasiliensis* en culture *in vitro*, ont montré que le brunissement peut s'expliquer globalement par une augmentation des activités peroxydases (néfaste) et une diminution de l'activité catalase (protectrice) (Housti *et al.*, 1991).

L'influence néfaste du NaCl peut avoir plusieurs origines: Augmentation de la pression osmotique ambiante et déficit hydrique, toxicité des ions et déséquilibre ionique réduisant la disponibilité d'éléments essentiels comme le calcium et le potassium (Tozowski, 1997; William *et al* 1951; Fernandez-Ballester *et al* 1998). En effet, cette étude sera complétée par des analyses biochimiques sur les lignées cellulaires sélectionnées et les témoins, afin de comprendre la nature du caractère sélectionné. Des essais de régénérations des plantes à partir de ces lignées sont aussi en cours au niveau de laboratoire de culture *in vitro* à El Menzeh.

Références bibliographiques

- Beloualy N., Bouharmont J. 1993. Amélioration de la tolérance à la salinité par sélection *in vitro* chez deux porte-greffes de Citrus. Ed.AUPELF-UREF Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes , pp : 301-304
- Bougerfaoui M. (1987). Viabilité induite de la tolérance à la salinité chez les agrumes, mém. de 3ème cycle agronomie, IAV Hassan II Rabat.
- Bouharmont J. 1994. Application of somaclonal variation and *in vitro* selection to plant improvement. Acta Horticulturae 355: 213-218.
- Caste WS., Tucker DPH., Krezdorn AH., Youtsey CO. 1993. Rootstocks for Florida Citrus. 92 p. University of Florida, Gainesville.
- Cirad. 1998. Productions fruitières et horticoles. www.cirad.fr
- Dix, P.J. 1980. Environmental stress resistance; selection in plant cell culture. Plant Cell Culture: results and perspectives. Sala, I., Parisi, B., Cella, R. and Ciferri, O. (Eds.), pp. 183 – 186. Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Collin, H. A., Burton, F. M., Ibrahim, K. M. et Collin, J. C. 1990. Transmission of salt tolerance from tissue culture to seed progeny in *Coleus Blumei*. Progress in Plant Cellular and molecular biology. Abstract of the VII th. International congress of plant tissue and cell culture. Nijkampa, H., Vanderplas, L. and Artrikj, J. (Eds.). Amsterdam. 151pp.
- Ezzoubir D. 2002. Comportement des porte-greffes traditionnels sous contraintes abiotiques au Maroc. Abstract, Séminaire à Montpellier CIRAD Flhor, France .
- Fernandez-Ballester G., Martinez V., Ruiz D., Cerda A. 1998. Changes in inorganic and organic solutes in citrus growing under saline stresses, J. Plant Nutr. 21 (12) 2497-2514.
- Garcia-Agustin P., Primo-Millo E. 1995. Selection of a NaCl-tolerant Citrus plant. Plant Cell Reports 14: 314-318
- Gmitter Jr., Grosser JW., Moore GA. 1992. Citrus. In Biotechnology of perennial fruit crops. Ed CAB International pp: 335-369.
- Gupta U.S. 1997. Salt Tolerance. Crop improvement 1-32.
- Housti, F., Coupe, M. et D'auzac, J. 1991. Facteurs enzymatiques du brunissement *in vitro* et des capacités embryogènes des cals d'*Hevea brasiliensis*. C.R. Acad. sci. Paris, t. 313, serie III, 461 – 466.
- Jacquemond C., Curk F., Ezzoubir D., Kabbage T. et Ollitrault P. 2002. Les porte-greffe, composante clef d'une agrumiculture durable. Cirad 2002.
- Kochba, I.D., Ben-Hayyim, G., Spiegel-Roy, R., Saad, S. et Newman, H. 1982. Selection of stable salt tolerant callus cell lines and embryo in *Citrus sinensis* L. OsbeC. And *Citrus aurantium* L.. Z. Pflanzenphysiol. 106:111 – 118.

- Maas EV., 1993. Salinity and citriculture. *Tree Physiol* 12: 195-216.
- Mademba-Sy F. 1998. La contrainte saline chez les fruitiers ligneux et en particulier chez les agrumes : réponses physiologiques et génétiques. Mémoire de D.E.A de génétique, adaptation et productions végétales. Université de Rennes E.N.S.A de Rennes.
- Maliga, D. 1984. Isolation and characterisation of mutant in plant cell culture. *Annual. Rev.Plant Physiol.* 35:510 – 524.
- Mayer, A. et Harel, E. 1981. Recent advances of the biochemistry of fruits and vegetables. J. Friend et M.J.C. Rhodes, Academic Press. pp. 171 – 180.
- McHughen, A. et Swartz, M. 1984. A tissue culture derived salt-tolerant-line of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Plant Physiol.* 117:109 – 117.
- McHughen, A. 1987. Salt tolerance through increased vigor in a flax line (STS-II) selected for salt tolerance *in vitro*. *Theor. Appl. Genet.* 74:727 – 732.
- Meredith, C.P. 1984. Selecting better crops from cultured cells. Gene manipulation in plant improvement. Gustafson, J.P. (ed). Plenum Press, New york. pp. 503 – 528.
- Monique L. et SIBI, Fakiri M. 2000. Androgenèse et gynogenèse, sources de vitrovariation et de la tolérance à la salinité chez l'orge. *Sécheresse* 11 (2) : 125-132
- Nabors, M. W., Gibbs, S. E., Bernstein, C. S. et Meis, M. E. 1980. NaCl - tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol.* 97:13 - 17.
- Murashige T. and Tucker D. P. H., 1969. "Growth factor requirements of citrus tissue culture." *Proceeding first international citrus symposium.* Vol 3.
- Ollitrault P. 1995. Amélioration des agrumes et biotechnologies. *Fruits* 50 : 267-279
- Sibi M. L. 1986. Non-mendelian heredity. Genetic analysis of variant plants regenerated from *in vitro* culture. In: Semal J, ed. *Somaclonal Variation and Crop Improvement.* Martinus Nijhoff, 53-83.
- Sibi M. L. 1996. Vitrovariation, potentialités nouvelles et sélection *in vitro*. In : AUPELF-UREF, ed. *Biotechnologie végétale.* 7-54.
- Sibi, M L., Sint Jan V, Costa de Macedo C, Kinet JM, Bouharmont J. 2000. Regeneration by *in vitro* androgenesis and gynogenesis to obtain somaclonal variation and tolerance to salinity in barley *Hordeum vulgare*. Volume 11, Number 2, 125-32 . *Revue Sécheresse et Science Planétaire.*
- Tozłowski T.T. 1997. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology* Monograph N° 1.
- Spiegel-Roy, 1996. Biology of Citrus. *Plant Science. Bulletin,* Vol 42, Issue 4.
- William C., Cooper and Bert S. Gorton 1951. Toxicity and accumulation of chloride Salts in Citrus on Various Rootstocks. *American society for horticultural science.* 143-146.

Zekri, M.(2002. Salinity and Citrus. Citrus industry magazine. February 2002.

Zenk, M.H. 1974. Haploids in physiological and biochemical research. Haploids in higher plants: advances and potential. Kasha, K. J. (Ed.), pp. 339 – 354. Univ. Guelph Press, Ontario, Canada.

Zid E. et Grignon C. 1991. Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes aux stress. Cas de stress salin et hydrique. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Ed: AUPELF-UREF. 91-108.