



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A. MIRA - BEJAIA  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique  
Laboratoire de Biotechnologies Végétales et Ethnobotanique

# Mémoire

Présenté par

Mme Amel DAHDOUH

Pour l'obtention du diplôme de **Magister**

Filière : Biologie

Option : Ingénierie Biochimique et Biotechnologie

Thème

**Optimisation des conditions de morphogenèse par culture *in-vitro* de *Citrus reticulata* et *Citrus lemon* de la collection de l'INRA de Oued Ghir (Bejaia)**

Soutenu le : 08/10/2014

Devant le jury composé de :

Mme Aicha ZEBBOUDJ	Professeur	Univ. de Bejaia	Président
Mme Fadila MAIZA-BENABDESSELAM	Professeur	Univ. de Bejaia	Rapporteur
Mme Bachra KHETTAL	MCA	Univ. de Bejaia	Examineur
M. Farid BEKDOUCHE	MCA	Univ. de Bejaia	Examineur

Année Universitaire : 2013/2014



## Remerciements

*Au terme de cette étude, je remercie avant, Dieu tout puissant de m'avoir guidé de suivre le chemin de la science et m'avoir permis la réalisation de ce présent travail. Tout d'abord, qui m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas abouti.*

*Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au laboratoire de Biotechnologies Végétales et Ethnobotanique de l'université A. MIRA – Bejaia, sous la direction du Madame F. MAIZA-BENABDESSELAM Professeur à l'université A. MIRA de Bejaia. Je tiens à vous exprimer ma gratitude de m'avoir gracieusement fait bénéficier, tout le long de ce travail, de ses précieuses compétences et connaissances, de sa longue expérience dans le domaine de biologie et pathologie des plantes et d'avoir été disponible.*

*Je tiens également à remercier Monsieur Z. TARIKI, Directeur de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Oued Ghir à Bejaia, pour l'intérêt manifeste qu'il a montré à l'égard de ce travail ainsi que pour m'avoir fournis le fruit pour avoir les graines de Citrus reticulata.*

*Je remercie vivement Madame A. ZEBBOUDJ, professeur à l'université A. MIRA de Bejaia, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de soutenance de ce travail.*

*Je suis très reconnaissant à Madame B. KHETTAL maître de conférence et Monsieur F. BEKDOUCHE maître de conférence à l'université A. MIRA - Bejaia, d'avoir accepté de participer au jury de ce mémoire et pour avoir accepté de juger mon travail.*

*Par ailleurs je veux exprimer mes remerciements particulièrement à Monsieur A. BENDJAOUD pour toute l'aide précieuse et ses conseils qu'il m'a prodigué le long de la réalisation de ce travail. Ses critiques instructives m'ont largement aidé à réaliser ce travail et je lui exprime encore ici ma sincère reconnaissance.*

*Je ne termine pas sans adresser mes remerciements à mon mari, ma famille et mes collègues, aux personnels du laboratoire de Biotechnologies Végétales et Ethnobotanique.*

*Enfin, nombreuses sont les personnes que je voudrais remercier pour leur aide scientifique, morale et leur amitié, que celles que je n'ai pas pu citer me pardonnent.*



# *Sommaire*

<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
------------------------------------	----------

## **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

1. Généralités sur les Citrus .....	3
1.1. Définition .....	3
1.2. Origine .....	3
1.3. Historique .....	3
1.4. Taxonomie .....	4
1.5. Classification .....	6
1.6. Ecologie et phénologie .....	7
a. Ecologie .....	7
b. Phénologie .....	7
1.7. Production .....	8
1.8. Domaines d'utilisation .....	9
1.9. Caractérisation morphologiques des agrumes .....	10
a. La fleur .....	10
b. Le fruit .....	10
c. La racine .....	11
d. Les feuilles et les rameaux .....	11
1.10. La croissance végétative .....	11
1.11. Les facteurs qui agissent sur la croissance végétatives .....	12
a. Les facteurs externes .....	12
b. Les facteurs internes .....	13
c. Influence du porte-greffe .....	13
1.12. Les ravageurs et les maladies .....	13
2. La culture in-vitro .....	14
2.1. Généralité .....	14
2.2. Les différentes techniques de culture in-vitro .....	15
a. micropropagation .....	15
b. culture de méristème .....	16
c. Embryogénèse somatique.....	16
d. Haplométhode.....	16
e. Culture de protoplaste .....	16
2.3. Les facteurs influençant la culture in-vitro .....	17
a. Température .....	17
b. lumière .....	17
2.4. les avantages et les inconvénients de la culture in-vitro .....	18
3 la micropropagation .....	18
3.1. Définition.....	18
3.2. Les méthodes de micropropagation.....	18
3.2.1 Culture de méristème.....	19
3.2.2 Organogenèse .....	20

a. Caulogénèse directe .....	20
b. Callogénèse indirecte .....	20
c. La rhizogénèse.....	21
3.2.3 Embryogénèse somatique .....	21
3.3 les facteurs de la micropropagation .....	22
3.3.1 effet de l'explant .....	22
• l'âge physiologique de l'organe .....	22
• la taille du génotype .....	22
3.3.2 influence du génotype .....	23
3.3.3 le milieu de base de culture .....	23
a. La composition chimique .....	23
b. Les substances organiques .....	24
c. Les régulateurs de croissance .....	24

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

1. Matériel végétal .....	29
2. Méthodes .....	29
2.1 Effet de l'hypochlorite de sodium (solution stérilisant) sur la capacité de germination de <i>citrus reticulata</i> .....	29
2.1.1 Préparation de matériel avant la stérilisation .....	29
2.1.2 Protocole de stérilisation des graines <i>citrus reticulata</i> .....	30
2.2 Effet de milieu de culture et types d'hormones de croissance sur l'organogénèse des explants de citrus limon .....	30
2.2.1 Les différents types de milieux de base .....	30
a. Le milieu de Murashige et skoog (MS) .....	30
b. Le milieu de Rangan (MBR) .....	31
c. Le milieu de martin (BN0 et BN100) .....	31
2.2.2 Les différents types d'hormones de croissance .....	31
a. Préparation de la solution des hormones de croissance .....	31
b. Les hormones de croissance utilisées pour l'induction de l'organogénèse d'explants de citrus limon.....	32
2.3 Mise en culture .....	32
2.3.1 La germination des graines.....	32
2.3.2 Le prélèvement des explants .....	33
2.3.3 Le repiquage de cal .....	33
3. Analyse statistique des résultats .....	33

## Chapitre III : Résultats et discussion

1. Effet de stérilisation des graines sur la germination.....	34
1.1 Résultats et interprétation .....	34
1.1.1. Effet du détergent sur le taux de germination .....	34
1.1.1.1. Effet de la concentration du détergent à différents temps d'exposition sans de tégument sur taux de la germination des graines <i>citrus reticulata</i> .....	34
1.1.1.2. Effet de la concentration du détergent à différents temps d'exposition avec de tégument sur taux de la germination des graines <i>citrus reticulata</i> .....	35
1.1.1.3. Analyse multi-variance de taux de germination.....	36
1.1.2. Effet du détergent sur le taux de contamination .....	37
1.1.2.1. Effet de la concentration du détergent à différents temps d'exposition sans tégument sur le taux de contamination graines <i>citrus reticulata</i> .....	37
1.1.2.2. Effet de la concentration du détergent à différents temps d'exposition avec tégument sur le taux de contamination graines <i>citrus reticulata</i> .....	38
1.1.2.3. Analyse multi-variance de taux de germination.....	38
1.1.3. Effet détergent sur le taux de nécrose.....	39
1.1.3.1. Effet de la concentration du détergent à différents temps d'exposition sans tégument sur le taux de nécrose graines <i>citrus reticulata</i> .....	39
1.1.3.2. Effet de la concentration du détergent à différents temps d'exposition avec tégument sur le taux de nécrose graines <i>citrus reticulata</i> .....	40
1.1.3.3. Analyse multi-variance de taux de germination.....	41
1.2. Discussion .....	42
2. Influence des conditions de culture sur la germination des graines de <i>citrus reticulata</i> .....	43
2.1. Influence de la température sur la germination des graines de <i>citrus reticulata</i> .....	43
2.2. Influence de la durée de l'obscurité sur la germination et la croissance des graines de <i>citrus reticulata</i> .....	44
2.3. Influence de tégument sur la germination et la croissance des graines de <i>citrus reticulata</i> .....	46
2.4. Influence de milieu de base sur la germination des graines de <i>citrus reticulata</i> .....	48
3. Action des hormones de croissance sur la culture des explants de <i>citrus lemon</i> .....	49
3.1. Induction de la callogénèse de <i>citrus lemon</i> suivant la combinaison hormonale .....	49

3.1.1	Intensité de la callogénese de citrus lemon suivant la combinaison hormonale d'auxine et de cytokinine .....	49
a.	Intensité de la callogénese de citrus lemon suivant combinaison d'ANA et BAP.....	50
b.	Intensité de la callogénese de citrus lemon suivant combinaison 2,4-D et de BAP .....	52
c.	Intensité de la callogénese de citrus lemon suivant la combinaison AIB et de BAP ou de KIN .....	54
3.1.2	Fréquence de la callogenése de citrus lemon suivant la combinaison hormonale d'auxine et de cytokinine .....	57
a.	Fréquence de la callogenése de citrus lemon suivant la combinaison d'ANA et BAP .....	57
b.	Fréquence de la callogenése de citrus lemon suivant la combinaison de 2,4-D et BAP .....	57
c.	Fréquence de la callogenése de citrus lemon suivant la combinaison d'auxine AIB et de cytokinines BAP et KIN ...	58
3.2.	Induction de la caulogenése indirecte de citrus lemon .....	60
3.3.	Induction de la caulogenése directe de citrus lemon .....	62
	<b>Conclusion .....</b>	<b>67</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>69</b>

## **Abréviations**

PH : potentiel hydrogène

ppm : partie par million

ha : hectare

LAI : Indice de la surface foliaire

AIA : *acide B indolacétique*

ARN : acide ribonucléique

IBA : l'acide indole-3-butyrique

NAA : l'acide naphthalène acétique

ANP : acide naphtoxyacétique

CPA : acide para-chlorophénoxyacétique

2,4-D: acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

BAP : acide benzylamino purine

2-IP : isopentényl-adénine

TDZ : thidiazuron

AG3 : Acide gibbéréllique

ABA : Acide abscissique

MS : milieu Murashige et Skoog

KIN : Kinitine

## Liste des tableaux

Tableau 01 - Principaux ravageurs des agrumes ;

Tableau 02 – Les différents facteurs de croissance et leurs propriétés ;

Tableau 03 - Constituants du milieu MS (Murashige et Skoog) ;

Tableau 04 – Les différents types d’hormones de croissance et leurs solvants ;

Tableau 05 - Différentes combinaisons hormonales additionnées pour l’induction de la callogenèse ;

Tableau 06 - Analyse de la variance du taux de germination en fonction de concentration; temps et de tégument.

Tableau 07 - Analyse de la variance du taux de contamination en fonction de la concentration, temps et de tégument ;

Tableau 08 - Analyse de la variance du taux de nécrose en fonction de la concentration, temps et de tégument;

Tableau 09 - Importance et aspect du cal en fonction de la concentration de ANA et BAP ;

Tableau 10 - Importance et aspect du cal en fonction de la concentration de 2,4-D et BAP;

Tableau 11 - Importance et aspect du cal en fonction de la concentration de AIB, BAP et KIN;

Tableau 12 - Fréquence et intensité de la caulogénèse directe de *Citrus lemon* suivant la nature du milieu de culture.

## Liste des figures

Figure 01 - Carte géographique montrant la ligne de démarcation de Tanaka ;

Figure 02 - Place du genre des *Citrus* dans l’arbre phylogénétique des agrumes ;

Figure 03 - Relation d’affinité entre certaines espèces de *Citrus* ;

Figure 04 - Principaux pays producteurs d’agrumes dans le monde ;

Figure 05 - Répartition géographique de la production d’agrumes destinés au marché de fruits frais pendant la période 2000-2004 ;

Figure 06 - Morphologie du fruit d’agrume ;

Figure 07 - les différentes méthodes de culture in vitro ;

Figure 08 - Les principales méthodes de micropropagation;

Figure 9 - Structure chimique des auxines naturelles

Figure 10 - Structure chimique des auxines naturelles

Figure 11- Rôle des hormones d'auxines et de cytokinines ;

Figure 12 - Enlèvement de tégument des graines ;

Figure 13 - Hotte à flux d'air laminaire avec matériels de stérilisation ;

Figure 14 - le taux de germination des graines de *citrus reticulata* sans tégument en fonction de la (NaClO) à différents temps d'exposition au détergent ;

Figure 15 - le taux de germination des graines de *citrus reticulata* avec tégument en fonction de la (NaClO) à différents temps d'exposition au détergent ;

Figure 16 - le taux de contamination des graines de *citrus reticulata* sans tégument en fonction de la (NaClO) à différents temps d'exposition au détergent ;

Figure 17 - le taux de contamination des graines de *citrus reticulata* avec tégument en fonction de la (NaClO) à différents temps d'exposition au détergent;

Figure 18 - le taux de nécrose des graines de *citrus reticulata* sans tégument en fonction de la (NaClO) à différents temps d'exposition au détergent ;

Figure 19 - taux de nécrose des graines de *citrus reticulata* avec tégument en fonction de la concentration de NaClO à différents temps d'exposition au détergent;

Figure 20 - Influence de la température sur le taux de germination des graines de *citrus reticulata* ;

Figure 21 - Taux de germination et de croissance des graines de *citrus reticulata* en fonction de la durée d'obscurité ;

Figure 22- Influence de différents milieux de base sur la germination des graines *citrus reticulata* ;

Figure 23 - Fréquence de la callogenèse suivant la combinaison d'ANA et BAP ;

Figure 24 - Fréquence de la callogenèse de *citrus lemon* suivant la combinaison de 2,4-D et BAP ;

Figure 25 - Fréquence de la callogenèse de *citrus lemon* suivant la combinaison d'AIB et BAP et KIN ;

Figure 26- pourcentage d'explants de citrus lemon callogénés en fonction des différentes combinaisons hormonales sur le milieu MS.

Figure 27- pourcentage d'explants de citrus lemon caulogénés en fonction des différentes combinaisons hormonales sur le milieu MS

### Liste des planches

Planche 1 - Influence de présence /absence du tégument sur la germination ;

Planche 2 - Influence de l'obscurité sur la croissance des graines ;

Planche 3 - La culture des graines sur différents milieux de base.

Planche 4 - Induction de la callogénèse sur milieu MS + ANA (0,5mg/L) et BAP (1mg/L) ;

Planche 5 - Induction de la callogénèse sur milieu MS + 2,4-D (0,1mg/L) et BAP (1mg/L) ;

Planche 6 - Induction de la callogénèse sur milieu MS + AIB (1mg/L) et BAP (0,1mg/L) ;

Planche 7 - Différence de l'intensité de cal entre milieu MS + ANA (0,5mg/L) et BAP (1mg/L) et milieu MS + 2,4-D (0,1mg/L) et BAP (1mg/L), milieu MS +AIB (1mg/L) et BAP (0,1mg/L) ;

Planche 8 - Callogénèse sur le milieu MS+ANA/BAP et 2,4-D/BAP ;

Planche 9 - la caulogénèse directe sur le milieu MS AIB 0,1 mg/L + BAP 1 mg/L ; MS ANA 0,1 mg/L + BAP 1 mg/L ; MS 2,4-D 0,1 mg/L + BAP 1mg/L.

# *Introduction générale*

## Introduction générale

Les *Citrus* constituent une ressource économique importante dans la production de leurs fruits qui sont appréciés dans le monde entier. Ils sont appelés également sous le nom d'agrumes et qui appartiennent à la famille des rutacées, regroupant des arbres et arbustes comptent 3725 variétés connues. Le centre d'origine du genre *Citrus* est asiatique précisément du sud-est d'Asie dans région indienne et il n'est connu dans la région méditerranéenne qu'à partir du V<sup>e</sup> et IV<sup>e</sup> siècle avant J.-C.

Les agrumes sont économiquement importants, ils représentent le groupe de fruits le plus important du commerce international. La production annuelle a dépassé 105 millions de tonnes dans la période 2000-2004 (Anonyme, 2004). La FAO distingue 4 groupes de productions d'agrumes. Il s'agit du groupe des oranges, du groupe des pamplemousses et pomélos, du groupe des limes et citrons et de celui des petits agrumes. Dans cette dernière catégorie, la Chine avec 4 694 471 tonnes, est en 2009 le premier pays producteur dans le monde. Elle est suivie du Nigéria (3 769 420 tonnes), de la Colombie (732218 tonnes) et de la Guinée Conakry (244 002 tonnes) (FAOSTAT, 2013). L'agrumiculture occupe donc une place importante en Afrique en général et en Afrique tropicale en particulier.

La production de *Citrus* en Algérie ne satisfait pas ses besoins nationaux, mais la qualité des fruits produits peut assurer jusqu'à 20.000 tonnes de fruits entre la clémentine et l'orange navel pour le marché international (Biche, 2012). Les semences importées ne présentent pas souvent les qualités requises et leur génotype n'est pas toujours conforme à nos conditions édapho-climatiques. De même, elle est menacée de temps à autre par les facteurs climatiques (pluviosité insuffisante), les maladies d'une manière générale et les viroses en particulier ainsi que les maladies bactériennes et les insectes, etc....

Or, Les agrumes sont atteints de nombreuses maladies à virus, à viroïdes et à mycoplasmes, maladies qui ont souvent de très grandes répercussions non seulement sur le rendement en fruits mais aussi sur la vie de l'arbre (Maïza, 1980). Pour remédier à cette situation, parfois alarmante dans certaines régions du globe, plusieurs pays ont utilisé les techniques de biotechnologies et fait appel aux techniques des cultures *in-vitro* pour tenter d'obtenir des plantes indemnes, afin de reconstituer des vergers sains et productifs, dont le rendement est satisfaisant par rapport aux méthodes traditionnelles et offrent plusieurs avantages notamment la rapidité dans les réponses obtenues.

Dans ce contexte, la multiplication *in-vitro* des espèces végétales est l'une des solutions proposées et il est intéressant de l'étudier. La multiplication *in-vitro* des plantes, souvent dite «micropropagation», consiste à reproduire un type parental donné, à partir d'un fragment plus ou moins grand de ce végétal. Comme dans le

cas de la multiplication végétative classique, appliquée depuis des siècles, cette reproduction ne s'effectue que par divisions mitotiques des cellules des tissus concernés (Auge et al, 1989). Aujourd'hui, le terme «multiplication *in-vitro*» recouvre, le plus souvent, la seule multiplication conforme d'individus performants. Celle-ci se réalise essentiellement par une prolifération abondante, mais contrôlée, de bourgeons préexistants. Dans la pratique, plus de 90% des plantes produites *in-vitro* relèvent de ce type de multiplication. Le restant de la production est issu de bourgeons néoformés, issus de tissus, de cals ou de cellules mis en culture (Boxus, 1989).

Le succès dans la culture de tissus dépend fortement de milieux nutritifs, l'état de la culture, et de matériau utilisé en tant que source pour des explants. Les conditions stériles sont primordiales à obtenir afin qu'aucun champignon ou bactérie ne vienne coloniser les milieux de culture, très favorables à leur prolifération, sous peine de nécrose de l'explant (Ziv et Altman, 2003). Des travaux ont visé les facteurs commandant le processus de culture *in-vitro*. Le saccharose et les régulateurs de croissance semblent stimuler ce processus (Banfalvi et al., 1997 ; Vreugdenhil et al., 1998) soit qu'ils sont seuls ou en interaction avec d'autres paramètres tels que la température (Akita et Takayama, 1994 ; Gopal et al., 1998), la photopériode (Seabrook et al., 1993 ; Pruski et al., 2001) ou l'intensité lumineuse (Gopal et al., 1997 ; Gopal et al., 1998).

Dans cette perspective s'inscrit notre travail qui consiste à maîtriser des techniques de stérilisation des graines de *Citrus*, indemnes de toutes les maladies transmissibles et d'assurer leurs conservation à l'abri de toute contaminations extérieures durant la micropropagation, à étudier les paramètres de milieu de culture qui influencent la germination des graines et à utiliser des hormones de croissance pour l'obtention d'un grand nombre de copies rigoureusement conformes par micropropagation directe ou indirecte à partir des explants de tiges.

Le présent mémoire comporte trois parties : la première consiste en une synthèse bibliographique de l'espèce étudiée, son importance ainsi que le mode de sa multiplication y compris des généralités sur la culture *in-vitro*. Dans la deuxième partie, une étude expérimentale comprenant une description du matériel végétal, de la préparation des milieux de culture, du protocole de stérilisation des graines et du repiquage des explants. La dernière partie est réservée à la présentation et à la discussion des résultats obtenus.

Chapitre I :  
*Synthèse*  
*Bibliographique*

## 1. Généralités sur les *Citrus*

### 1.1. Définition

D'après Loussert (1989), le mot agrumes d'origine italienne, est un mot collectif masculin pluriel qui désigne les fruits comestibles par extension aux arbres qui les portent appartenant au genre *Citrus*.

Les principaux agrumes cultivés pour la production de fruit sont les orangers, les mandariniers, les clémentiniers, les citronniers et les pomelos.

### 1.2. Origine

Les agrumes sont originaires des pays du sud-est asiatique, selon plusieurs légendes, la culture des agrumes est connue depuis plus de 4000 ans. Dans le bassin méditerranéen, le Liban est un des plus anciens pays à avoir pratiqué la culture des agrumes sur une grande échelle (Khan, 2007).

Le cédrat fut le premier agrume connu du bassin méditerranéen depuis 300 ans avant J-C. Les Romains le connaissaient sous le nom de pomme de Médie. Les anciens médecins Arabes du Moyen-Orient préparaient certains médicaments à partir de *bigaradier*. C'est des régions côtières au sud de la Palestine, que les croisés ont rapporté et fait connaître en Europe à la fin de XI<sup>ème</sup> siècle le *citron* et le *bigaradier* (Risso et Poiteau, 1818).

Le mandarinier est originaire de Chine, son appellation (mandarinier) est liée à la couleur de sa peau qui est la même que la robe de soie portée par les mandarins, la culture n'est introduite dans le bassin méditerranéen qu'en XIX<sup>ème</sup> siècle (Nicolosi et al., 2000).

### 1.3. Historique

Les agrumes semblent provenir du Nord-est de l'Inde et de la Birmanie, la Chine en étant prévu centre secondaire de distribution d'où les agrumes se sont propagés vers l'Indochine et la Malaisie (Nord-est de l'Asie) et enfin vers le Japon (Khan, 2007), dans cette zone l'hybridation naturelle est très fréquente dans ce groupe des plantes et a favorisé l'apparition de certaines espèces dans des sites différents (Parfonry, 2001). Tanaka (1954) a proposé une ligne de démarcation théorique allant du nord-ouest aux frontières de l'Inde, à la province du Yunnan en Chine, au sud de l'île de Hainan (Fig. 01) (Khan, 2007).

Les agrumes auraient été diffusés au Moyen-Orient, puis dans les pays méditerranéens, par les échanges commerciaux. C'est ainsi, qu'à la fin du 16<sup>ème</sup> siècle, les agrumes à l'exception du mandarinier, s'étaient répandus dans presque toutes les régions tropicales et subtropicales (Parfonry, 2001).



Figure 01 - Carte géographique montrant la ligne de démarcation de Tanaka (Khan, 2007).

#### 1.4. Taxonomie

La majorité des taxonomistes considèrent que les espèces d'agrumes appartiennent aux ordres *Géraniales*, la famille des *Rutacées* et la sous famille *Aurantioideae* (Engler, 1931).

Swingle a subdivisé l'*Aurantioideae*, la sous-famille d'orange en deux familles : *Clauseneae* avec 5 genres et *Citreae* avec 28 genres y compris le *Citrus* et d'autres genres à savoir *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus*, *Microcitrus* et *Clymenia*. Sur la figure 02, familles, sous-familles, genres et espèces sont énumérés d'après Swingle et Reece (1967).

La famille *Citreae* comprend 3 sous-familles : *Triphasiinae*, *Balsamocitrinae* et *Citrinae* ; ce dernier avec 13 genres, a été classé en 3 groupes (Swingle et Reece, 1967). Le groupe A des agrumes primitifs ou arbres fruitiers avec 5 genres, *Severinia*, *Pleiospermium*, *Burkillanthus*, *Limnocitrus* et *Hesperange-ethusa*, le groupe B près des agrumes arbres fruitiers avec seulement 2 genres, *Citropsis* et *Atalantia*, et le groupe C des vrais arbres d'agrumes comprend 6 genres, *Fortunella*, Ermitage-agrumes, *Poncirus*, *Clymenia*, *Microcitrus* et *Citrus* (Khan, 2007).

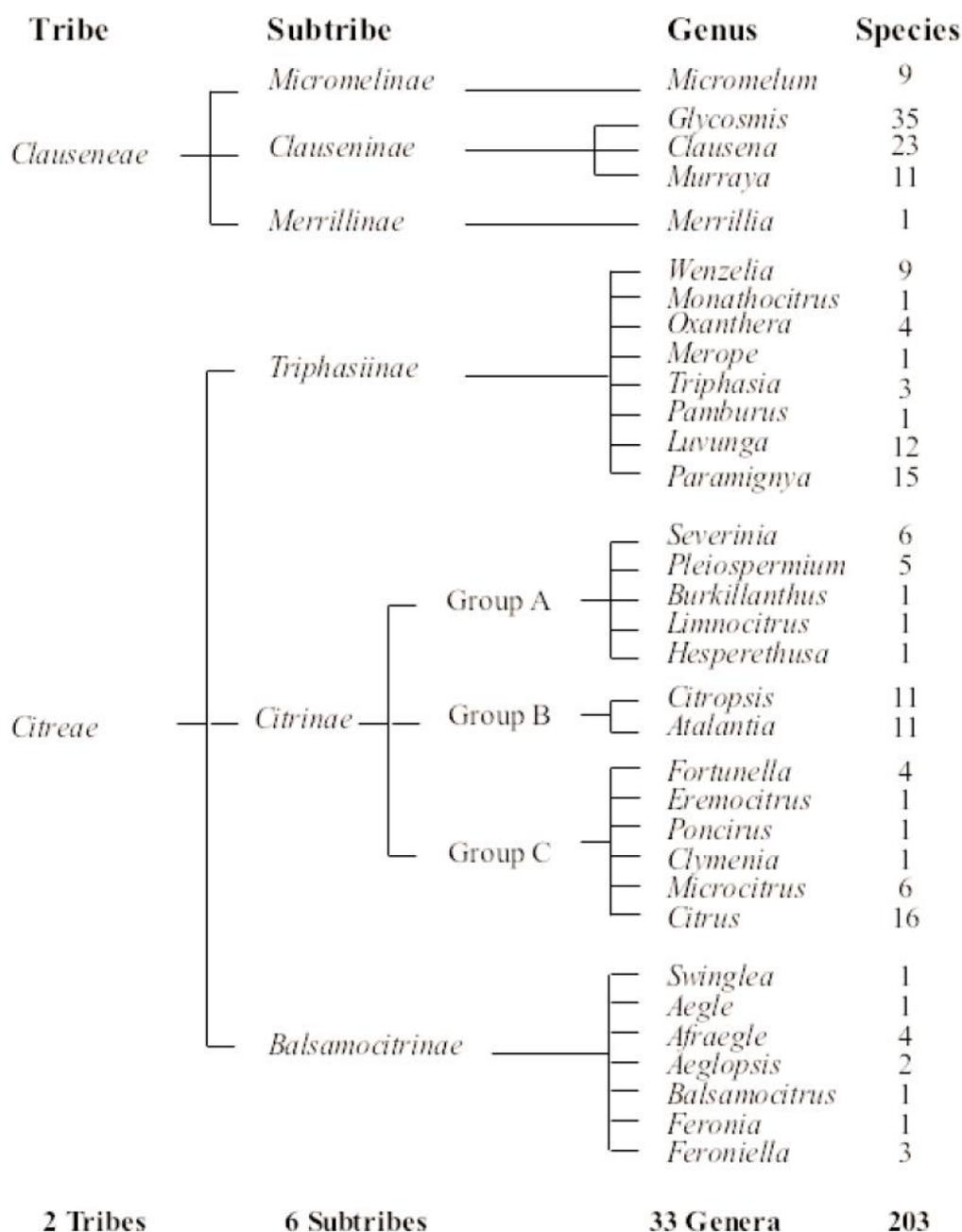


Figure 02 – Place du genre des *Citrus* dans l’arbre phylogénétique des agrumes

Plusieurs chercheurs ont utilisé diverses techniques pour analyser la composition biochimique des différentes parties de la plante de *Citrus* à savoir des feuilles, des fleurs et des fruits. En 1976, Barrett et Rhodes ont réalisé une étude taxonomique numérique des relations d'affinité dans la culture de *Citrus*, et une étude phylogénétique qui a évalué les caractéristiques morphologiques et biochimiques de feuille, fleur et fruit de 146 arbres.

Des résultats similaires ont été communiqués par Scora en 1975 et en 1988, où on a ajouté encore d’autres véritables espèces, *Citrus halimii*, une espèce

précédemment décrites par Stone et al. en 1973, une nouvelle espèce de Malaisie péninsulaire et de Thaïlande.

Barrett et Rhodes en 1976 ont pu établir une relation d'affinité entre certaines espèces de *Citrus* (Fig. 03), indiquant une probable origine des agrumes cultivés et quelques agrumes et des genres apparentés (khan, 2007).

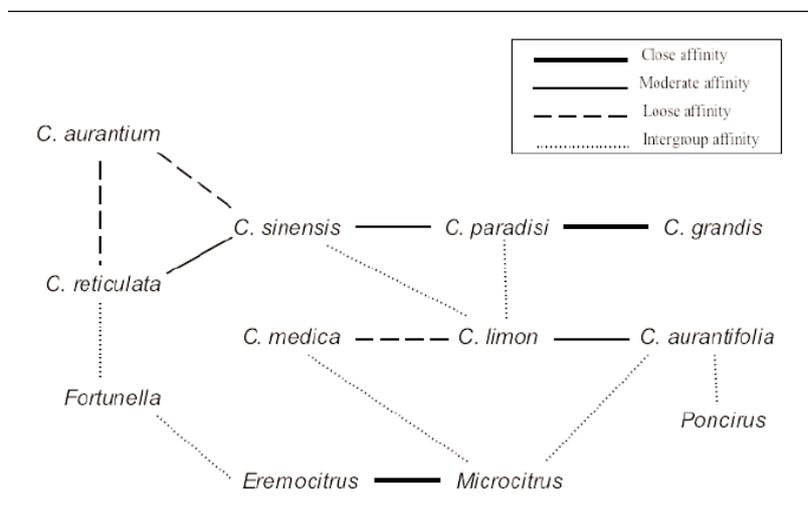


Figure 03 - Relation d'affinité entre certaines espèces de *Citrus* d'après barrette et Rhodes 1976.

### 1.5. Classification

D'après Guignard et Dupont (2011), la position systématique des agrumes est comme suit :

<b>Règne :</b>	Végétal
<b>Embranchement :</b>	<i>Spermaphytes</i>
<b>Sous-embranchement :</b>	<i>Angiospermes</i>
<b>Classe :</b>	<i>Eudicotylédones</i>
<b>Sous-classe :</b>	<i>Rosidées</i>
<b>Famille :</b>	<i>Rutaceae</i>

Les principaux genres sont :

- Le genre fortunella :
  - ✓ *Fortunella japonica* (T) kumquat rond.
  - ✓ *Fortunella margarita* (L) kumquat ovale.
  - ✓ *Poncirus trifolia* (L).
- Le genre *Citrus* Linné :
  - ✓ *Citrus aurantium* (L), bigarade
  - ✓ *Citrus sinensis* (L), oranger doux

- ✓ *Citrus reticulata* (L), mandarine
- ✓ *Citrus clementina* (L), clémentine
- ✓ *Citrus medica* (L), cédratier
- ✓ *Citrus paradisis* (racf), pamplemousse
- ✓ *Citrus limon* (L), citronnier

## 1.6. Ecologie et phénologie

### a. Écologie

Les agrumes présentent une grande capacité d'adaptation à des conditions pédoclimatiques très différentes. La culture des agrumes est possible partout où la température moyenne de l'année est supérieure à 13°C et inférieure à 39°C. Les agrumes préfèrent les climats maritimes des zones subtropicales. En terme de besoins en eau, 120mm par mois, soit 1200 à 1500mm par an, représentent une quantité d'eau au-dessous de laquelle la culture des agrumes nécessite une irrigation (Anonyme, 2006).

La lumière a une action très remarquée sur la qualité et la coloration des fruits. Les arbres fruitiers sont plus exigeants sur les caractéristiques physiques du sol et non sur les caractéristiques chimiques qui peuvent être corrigées par des apports d'engrais et d'amendements. Les sols doivent être profonds et de préférence légers (sablo-argileux ou argilo-sableux), bien drainés. Les agrumes redoutent les eaux salines (au-dessus de 0,5%). Le pH idéal est situé entre 5,5 et 7,5 (Walali-Loudyi et al, 2003). C'est à cet effet que le choix du porte-greffe est un des facteurs essentiels de réussite car il peut conférer à la plante une tolérance à des maladies et à des contraintes abiotiques (salinité, pH, froid, sécheresse, calcaire...) (Van-Ee, 2005).

### b. Phénologie

Le développement de la frondaison des agrumes se fait sous forme de flux végétatif ou poussée foliaire. Ces flux végétatifs succèdent à des périodes d'arrêt végétatif. Ce phénomène s'observe même en climat tropical humide où les conditions permettent une activité végétative continue (Praloran, 1971). Il existe généralement 3 flux végétatifs par an. Ils commencent avec le début des pluies. Le premier flux, qui est de loin le plus important (longueur et nombre de rameaux émis), débute en mars avec le retour des pluies. Le second se fait au mois d'août, il est également déclenché par le retour des pluies. Le dernier survient en octobre.

La floraison se produit en même temps que la pousse qui suit le repos végétatif. Les fleurs sont isolées ou en grappes et se forment sur le bois de l'année précédente (Praloran, 1971). La floraison est continue tout au long de l'année sur les citronniers et limettiers. Sur les autres espèces on peut avoir une ou deux périodes de floraisons par an. Sur un même arbre, on peut ainsi retrouver des feuilles, des fleurs et des fruits de différents âges (Van-Ee, 2005).

## 1.7. Production

Les productions d'agrumes proviennent essentiellement des régions méditerranéennes et tropicales. En 1988, la superficie totale plantée en agrumes a été évaluée à plus de 3 millions d'hectares répartis sur une aire très large située approximativement entre les 40° de latitudes Nord et Sud tout autour du Monde (Anonyme, 2004 ; Polese, 2008). Les agrumes sont donc de nos jours implantés dans toutes les zones du monde où leur production est possible. Les pays producteurs forment une ceinture terrestre entre le 40<sup>ème</sup> parallèle nord et sud (Fig. 04).

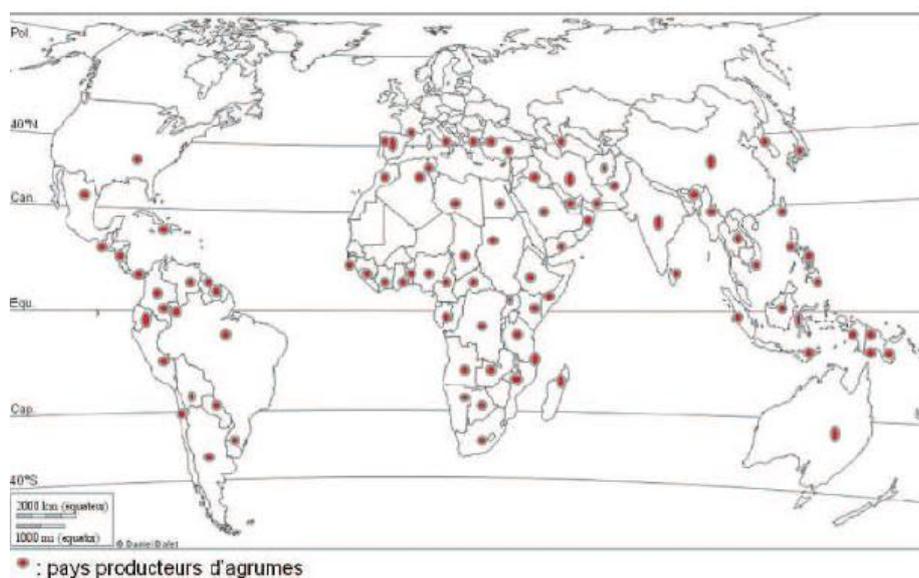


Figure 04 - Principaux pays producteurs d'agrumes dans le monde pendant la période 2000-2004 (Golda, 2011).

Initialement les Etats-Unis et la zone méditerranéenne produisaient les plus grandes quantités. La production s'est ensuite développée au Brésil et en Asie (Griffon et Loeillet, 2000). Actuellement, l'agrumiculture occupe une place importante en Afrique en général et en Afrique tropicale en particulier. Huit pays africains (Nigéria, Guinée Conakry, Tunisie, Sierra Léone, Kenya, Angola, Tanzanie et Côte d'Ivoire) figurent dans la liste des 20 plus grands producteurs mondiaux des petits agrumes.

La production annuelle mondiale a dépassé 105 millions de tonnes dans la période 2000-2004 (Anonyme, 2004). Les agrumes sont commercialisés soit en fruits frais, soit transformés (jus de fruits, liqueurs, confitures etc...). La figure 05 présente la répartition géographique de la production d'agrumes destinés au marché de fruits frais dans la période 2000-2004. Les huiles essentielles d'agrumes représentent également un des produits commercialisés à haute valeur ajoutée. Elles sont extraites de fleurs, d'écorces, de feuilles et de fruits.

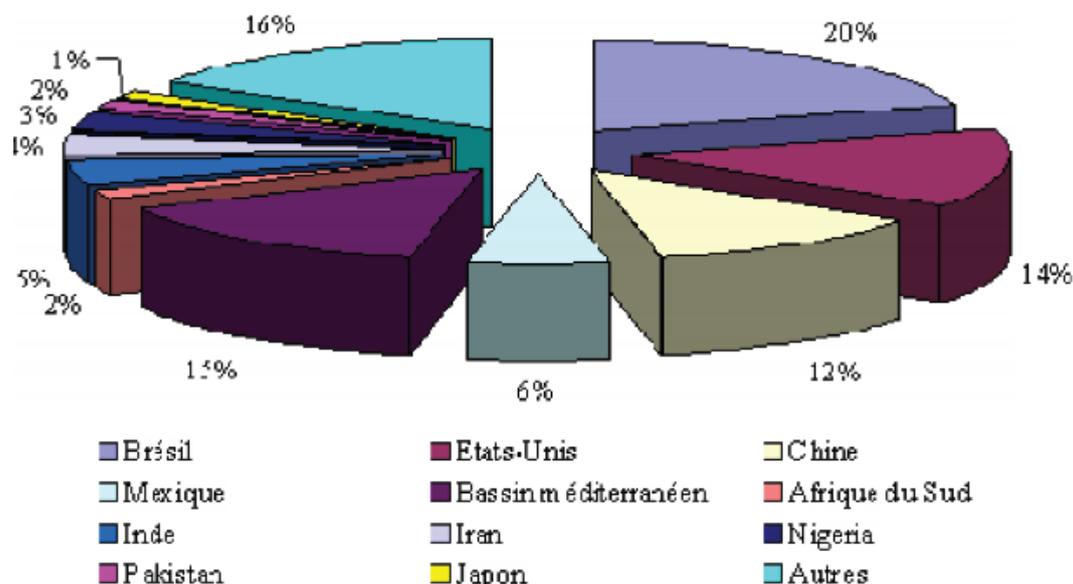


Figure 05 - Répartition géographique de la production d'agrumes destinés au marché de fruits frais pendant la période 2000-2004 (Golda, 2011).

**La production de *Citrus* en Algérie :** L'Algérie possède une collection variétale composée de 178 variétés d'agrumes constituant un patrimoine génétique inestimable. En nombre d'arbres, les *Citrus* occupent le second rang après l'*olivier*, mais leur importance économique la classe nettement en tête de nos productions fruitières (Kerboua, 2002).

L'Algérie disposait d'une superficie de 45.000 ha en agrumes à l'indépendance. Certes, en 2011, la superficie en agrumes s'étalait sur 63.323 ha, en dépit de la disparition de nombreux vergers qui faisaient partie du patrimoine agricole algérien (Anonyme, 2013).

La production d'agrumes des wilayas de Béjaïa et de Tizi-Ouzou est de 10,3 millions de quintaux durant 2012/2013 dont l'objectif des contrats de performances tablaient sur 10,9 millions contre 9,3 millions de quintaux lors de la campagne 2011/2012 (Anonyme, 2013).

### 1.8. Domaines d'utilisation

- Les *Citrus* sont souvent utilisés en cosmétologie dans l'industrie des parfumes ou ils forment la famille des hespéridés, la fabrication de savons et les eaux de Cologne désodorisant. en industries alimentaires ils ont utilisés comme aromatisants en confiseries, pâtisseries, les glaces...ect (Nelly, 2008).
- Les fruits revêtent une grande importance économique. En effet, ils constituent une source des revenus tant pour les producteurs individuels que pour les pays producteurs. L'arboriculture fruitière soutien les gens qui

la pratiquent par la vente de ses produits, pouvant facilement améliorer leurs conditions de vie tout en augmentant les niveaux de revenu (Bonkena, 2001).

- Les huiles essentielles de *Citrus* possèdent beaucoup de vertus thérapeutiques. En effet elles possédant antimicrobiennes, tonique, stimulante, stomachique, carminative, diurétique, antispasmodique. Elles sont aussi efficaces en dermatologie (entretien de la peau et soins). En cas de colique, dans les états fiévreux et aussi dans la lutte contre l'obésité (Bardeau, 2009).

### 1.9. Caractéristiques morphologiques des agrumes

Les agrumes sont des petits arbres ou arbustes, dont la taille peut varier de 4 à 12 mètres de haut suivant les espèces. Les branches sont parfois épineuses, plus particulièrement lorsque l'arbre est issu de semis. Les feuilles sont trifoliées (poncirus et ses hybrides) ou simples (*Citrus*, fortunella). Elles peuvent avoir un pétiole aile développe comme chez le bigaradier et les pomelos (Bakry et al, 2009).

#### a. La fleur

Les fleurs sont généralement de couleur blanche, de 4 à 5 pétales imbriqués, souvent recourbés vers l'arrière, souvent très odorantes. Selon les espèces, la floraison en grappe ou en fleur isolée est très abondante. L'époque de floraison varie selon les espèces et le climat, de mars à juillet. La pollinisation est assurée par le vent et les insectes (Ozenda, 2000).

#### b. Le fruit

Selon les espèces, les fruits mûrissent de novembre à mars. Il faut donc 7 à 10 mois pour qu'une fleur se transforme en fruit mûr, couleur et taille varient selon les espèces et leurs cultivars. L'écorce varie aussi beaucoup, de la très fine mandarine au *cédrat* très épais. Les graines sont selon les variétés, inexistantes (*mandarines Satsuma*) ou très nombreuses (*bigaradier*). Leur quantité varie en fonction des différentes plantes en présence lors de la pollinisation. La maturité s'accompagne d'une modification de couleur du fruit et d'un enrichissement en sucres (Fig. 06). Le froid lié aux variations d'intensité lumineuse (durée du jour) est responsable de la coloration des fruits. Ainsi, sous les tropiques, l'orange reste souvent verdâtre. (Bachès et Bachès, 2002).

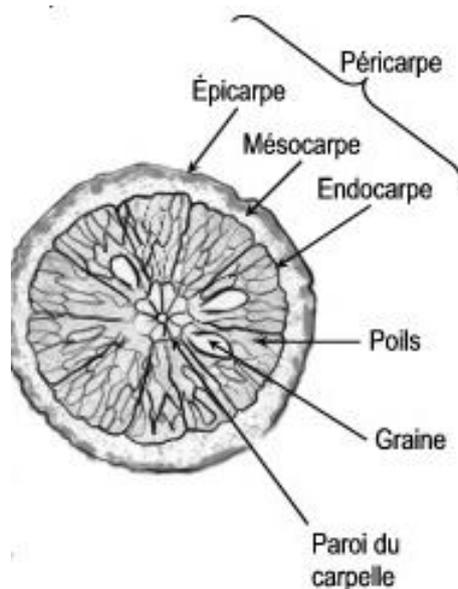


Figure 06 - La morphologie du fruit d'agrumes

### c. La racine

À part les *Poncirus* qui émettent des racines pivotantes profondes, l'enracinement est superficiel et peut s'étendre jusqu'à 6 à 7 mètres du pied de l'arbre, à la recherche de l'eau et des éléments nutritifs. Cette caractéristique explique la forte sensibilité des agrumes à la sécheresse (Luttge, 2002).

### d. Les feuilles et les rameaux

En général, les agrumes se ramifient facilement et naturellement, et possèdent une frondaison dense. Il y a plusieurs poussées de végétation dans l'année, la plus importante étant au printemps, dès que la température dépasse 12°C. Les rameaux sont assez souvent couverts d'épines. Les *Poncirus* ont des feuilles trifoliées et caduques tandis que les *Citrus* et *Fortunella* ont des feuilles entières et persistantes. Cette persistance n'est pas éternelle. La feuille a une durée de vie limitée et les chutes interviennent naturellement à l'automne et au printemps quand de nouvelles pousses apparaissent (Bachès et Bachès, 2002).

#### 1.10. La croissance végétative

La croissance d'une culture représente les transformations quantitatives et qualitatives qui accompagnent le parcours des différentes étapes de sa vie depuis l'implantation jusqu'à la maturité (Hannah et Jan, 2003).

Une plante est soumise à deux types de croissance qui va conditionner en particulier sa mise en forme, peut être analysé à travers l'étude des deux processus fondamentaux : d'une part, l'organogenèse et l'élongation des rameaux conditionnant la croissance primaire, d'autre part, le processus de ramification par

lequel un axe peut donner naissance à de nouveaux axes ( Lüttge et al, 1992). La croissance secondaire correspond à la croissance en épaisseur du rameau résultant du fonctionnement du cambium ( Caraglio et al 1997).

### **1.11. Les facteurs qui agissent sur la croissance végétative**

#### **a. Les facteurs externes**

**La température :** Dans les régions tropicales, l'initiation de l'activité végétative chez les agrumes ne peut avoir lieu qu'à des températures entre 12,5°C et 35°C mais au-delà de 36°C, la croissance végétative est arrêtée (Praloran, 1971, Cassin et al, 1969).

Dans un verger d'agrumes, la température de l'air a un effet certain sur la distribution et l'importance de la croissance des pousses. Durant le printemps la pousse survient sur un grand nombre de points végétatifs qui génèrent des rameaux à entre-nœuds courts, les températures sont généralement comprises entre 12°C et 25°C. Par contre, la pousse d'été survient sur un nombre restreint de points végétatifs qui génèrent des rameaux ayant des nœuds longs, dans cette période les températures sont élevées (entre 25°C et 30°C en moyenne) (Davies et Albrigo. 1994).

La température du sol conditionne également la croissance des racines, qui ne peut avoir lieu que si cette température est supérieure à 7°C. En effet, cette dernière influence beaucoup l'élongation des racines qui devient continue dans le temps tant que la température du sol est comprise entre 17°C et 30°C (Davies et Albrigo, 1994). elle agit également sur la levée de la dormance des bourgeons en la stimulant, et sur la croissance des pousses en l'activant (Hall et al., 1977).

**La lumière :** Le LAI (Leaf Area Index = Indice de la surface foliaire) est la mesure du total des surfaces foliaires par unité de sol couvert par la plante en question. Cet indice nous permet d'évaluer la croissance végétative chez les plantes. En 1979, Jahn est parvenu à prouver que chez les agrumes, il y a une relation curvilinéaire entre le LAI et le flux photosynthétique des photons. En effet quand cet indice est élevé, la lumière devient un facteur limitant pour la croissance des pousses à l'intérieur de la frondaison, ainsi la plupart des pousses croissent à l'extérieur de la couronne (Davies et Albrigo, 1994).

**La nutrition hydrique :** Vu que l'arbre est exigeant en eau, la nutrition hydrique est l'un des facteurs les plus importants à considérer en agrumiculture. Son importance vient du fait qu'elle assure le transport des éléments nécessaires à la croissance et participe aux processus métaboliques au niveau de l'arbre (Anonyme, 1968).

En 1994, Davies et Albrigo ont remarqué que l'eau entre dans la détermination du nombre de pousses végétatives par cycle ainsi que dans la détermination du nombre de points végétatifs qui va donner lieu à des pousses. Or, un stress hydrique prolongé peut se traduire par un arrêt de croissance végétative (Anonyme, 1968), néanmoins, certains auteurs affirment qu'un stress hydrique pendant une courte durée peut initier une pousse végétative (Goell et Cohen, 1981).

## **b. Les facteurs internes**

Ils s'agissent des substances élaborées au niveau de l'arbre lui-même, notamment les hormones de croissances à savoir les auxines, les cytokinines et l'acide gibbérellique dont l'action est indispensable à la multiplication, l'élongation et la différenciation des cellules végétales (Anonyme, 1968).

En effet, le rapport entre les concentrations de ces substances, à l'intérieur de l'arbre, détermine le devenir du point végétatif et contribue ainsi à la restauration d'un équilibre entre la croissance végétative, la mise à fleur et la mise à fruit (Myers et Ferree, 1983).

En 1972, Goldschmidt et Monselise ont montré que des applications d'acide gibbérellique (AG3) en période de floraison chez les *Citrus*, stimulent la croissance des pousses végétatives; chose confirmée en 1977 par Jones et al. sur la variété *Valencia Late*.

Par ailleurs, en 2004, Heller et al. ont constaté que l'auxine à des concentrations variant entre  $10^{-5}$  et  $10^{-3}$  mg/L (ppm) initie l'élongation des cellules au niveau du méristème, et que cette même hormone stimule la division des cellules et l'augmentation de leur taille en présence de la cytokinine.

## **c. Influence du porte-greffe**

En agrumiculture, le porte-greffe joue un rôle déterminant dans la vitesse de croissance et la vigueur des arbres (Anonyme, 1968). En effet, certains porte-greffes confèrent aux variétés une croissance rapide tels que le bigaradier, le *citranger Troyer* et le *Rough lemon* ; et d'autres, comme le *Poncirus trifoliata* et le mandarinier *Cléopâtre*, qui leur attribuent une croissance lente (Praloran, 1971).

### **1.12. Les ravageurs et les maladies**

Comme toute autre plante, l'agrumes est sujet aux dommages provoqués par les parasites et les maladies. Les maladies virales sont certainement les affections les plus graves et les plus destructrices des *Citrus* dans le monde entier. Dans le bassin méditerranéen, elles sont responsables de troubles qui diminuent, non seulement la productivité des arbres, mais aussi leur longévité.

Les insectes constituent une part non négligeable de cette baisse de rendement. Les dégâts dus à ces espèces se traduisent par l'affaiblissement de l'arbre en prélevant la sève et en réduisant la surface photosynthétique des feuilles suite à l'installation de la fumagine (Tab. 01) (Biche, 2012).

Tableau 01 - Les principaux ravageurs des agrumes (Biche, 2012)

Ravageurs	Nom		Dégâts
	Scientifique	Commun	
Insectes	<i>Aonidiella aurantii</i>	Pou de Californie	Attaquent les feuilles, les rameaux et les fruits. Développement de la fumagine, chute des feuilles et dépérissement des fruits.
	<i>Lepidosaphes beckii</i>	La cochenille moule	
	<i>Lepidosaphes glowerii</i>	La cochenille virgule	
	<i>Chrysomphalus dictyospermi</i>	Pou rouge de Californie	
	<i>Parlatoria ziziphi</i>	Pou noir de l'oranger	
	<i>Parlatoria pergandei</i>	Cochenille blanche	
	<i>Saissetia oleae</i>	Cochenille H	
	<i>Icerya purshasi</i>	La cochenille australienne	
	<i>Coccus hesperidum</i>	Cochenille plate	
	<i>Ceroplastes sinensis</i>	Cochenille chinoise	
	<i>Pseudococcus citri</i>	La cochenille farineuse	
	<i>Aphis spiraeicola</i>	Puceron vert des citrus	Avortement des fleurs et déformation des très jeunes feuilles. Développement d'abondantes colonies de pucerons sur les parties jeunes des arbres.
	<i>Aphis gossypii</i>	Puceron vert du cotonnier	
	<i>Toxoptera aurantii</i>	Puceron noir des agrumes	
<i>Myzus persicae</i>	Puceron vert du pêcher		
	<i>Aleurothrixus floccosus</i>	L'aleurode floconneux	Provoque des souillures importantes ainsi que le développement de la fumagine.
	<i>Dialeurodes citri</i>	L'aleurode des citrus	Provoque des nuisances et développe de la fumagine.
	<i>Phyllocnistis citrella</i>	Mineuse des agrumes	Attaque les feuilles et les jeunes pousses.
	<i>Ceratitis capitata</i>	Mouche méditerranéenne des fruits	Provoque la pourriture des fruits.
Nématodes	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Nématode des agrumes	Croissance ralentie des arbres ; Pas de symptômes spécifiques de cette espèce
Acarie	<i>Tetranychus cinnabarinus</i>	Acarie tisserand	Provoquent des nécroses, décoloration et chute des feuilles, des fruits et des bourgeons.
	<i>Hemitarsonemus latus</i>	Acarie ravisseur	
	<i>Aceria sheldoni</i>	Acarie des bourgeons	

## 2. La culture *in-vitro*

### 2.1. Généralité

La multiplication *in-vitro* trouve son fondement dans le concept de " totipotence cellulaire " énoncé au début du siècle : la cellule, unité morphologique et physiologique de l'être vivant, est capable d'autonomie. Elle possède toute l'information génétique nécessaire à régénérer la plante entière, à condition bien sûr de créer les conditions favorables à ce développement. Ce concept énoncé des 1878 par Bernard, formulait les principes théoriques de la création d'un système

artificiel dans lequel les organes pourraient survivre hors de l'influence de l'organisme entier (Nozeran et Bancilhon, 1972).

En 1902, la culture *in-vitro* d'organes isolés de plante a été commencée par Haberlandt qui a observé les potentialités naturelles de la multiplication végétative (Lafon et al., 1998).

En 1934, White réussit la culture de racines de tomate sur un milieu contenant de l'eau, des sels minéraux, un extrait de levure et du sucre et une hormone végétale l'auxine (Lafon et al., 1998).

En 1939, Gautheret obtient à partir de tissu de carotte, un amas de cellules dédifférenciées.

En 1955, la découverte de la kénétine, substance douée d'une puissante activité caulogène, puis d'autres cytokinines ont permis de provoquer presque à volonté la néoformation de bourgeons adventifs (Margara, 1982).

En 1962, Murashige et Skoog étudient la multiplication végétative du tabac et mettent au point le premier milieu de base pour la culture *in-vitro*. Ce milieu contient des sels minéraux, des sucres, des vitamines et des hormones. Ce milieu rend possible la culture et la prolifération de méristèmes de tiges (Murashige et Skoog, 1962).

## 2.2. Les différentes techniques de culture *in-vitro*

Elles peuvent être regroupées en cinq grandes catégories (fig. 07):

- a. **La micropropagation** : La micropropagation *in-vitro* apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé (Dris, 2005). Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales et horticoles (Bretaudière et Faure, 1992).

Elle est ainsi employée pour la production des semences et pour la collection et la distribution du germoplasme dans le monde entier. A cette fin, des vitro-plants indemnes de virus sont utilisés comme produit de départ. L'analyse moléculaire des vitro-plants propagés a prouvé que la micropropagation donne des vitro-plants génétiquement stables (Potter et Jones, 1991).

La micropropagation *in-vitro* est plus ou moins utilisée dans la production de plantes conformes pour les premières générations de multiplication. Selon Lê et al, pour produire des plantes génétiquement modifiées, la régénération doit donner des plantes conformes (Lê et al., 2002).

- b. Culture de méristème :** Le méristème est un petit organe composé de cellules méristématiques à division rapide, il constitue le matériel idéal de départ étant donné que le méristème se développe d'une manière génétiquement stable et réduit le niveau d'infection virale (Espinosa et al, 1992). Cette technique est donc utilisée pour obtenir des plantes saines à partir des plantes viroses (Auge, 1989 ; Griffiths et al, 1990). Dès 1952, George Morel a réussi à obtenir une plante entière à partir d'un méristème (Dris, 2005), et selon Téoulé, chez une plante virose la répartition du virus semble très variable selon l'organe, le méristème en particulier est une structure très protégée et est généralement indemne de virus (Téoulé, 1999).
- c. Embryogénèse somatique :** Un apport important de la technique des cultures *in-vitro* à la biologie a montré que des cellules somatiques pouvaient produire des structures comparables à des embryons, méritant l'appellation d'embryons somatiques (Margara, 1982). Ces embryons peuvent se développer à partir des cellules à 2n chromosomes issues de feuilles, racines ou tige (Auge, 1989). L'embryogénèse somatique est un processus par lequel les cellules du sporophyte donnent naissance, sans fusion gamétique (Seabrook et Douglass, 2001), à des embryons qui passent par des stades embryologiques caractéristiques (Redenbaugh, 1993 ; Gray et al., 1995).
- d. Haplométhode :** Ces techniques ne démarrent pas des cellules somatiques mais de cellules gamétiques (Demarly, 1985). Ce sont des cultures d'anthers (Androgenèse) ou de microspores, ou de sacs embryonnaires ou ovaires (Gynogenèse) (Peters, 1986). Ces processus permettent d'obtenir des lignées pures, en passant par l'haploïdisation puis le dédoublement (Demarly, 1985). Alors que, dans les méthodes classiques, la fixation des lignées requiert plusieurs cycles d'autofécondation. Elle permet donc un gain de temps appréciable, également un gain en efficacité de la sélection et une diminution du coût de production des lignées pures (Labrani et al., 2005).
- e. Culture de protoplaste :** Ces cellules végétales dépourvues de paroi peuvent être obtenues soit à partir d'organes de plantes, soit à partir de suspensions cellulaires (Robert et al., 1998). Les exigences nutritionnelles des protoplastes nécessitent une composition minérale adaptée, notamment pour le calcium qui joue un rôle important par son influence sur les divisions (Karp et al., 1982).

La culture de protoplastes permet d'introduire facilement de nouveaux gènes dans le génome de la plante, on obtient des plantes transformées (Rossell et Villalobos, 1992), elle est très fortement inductrice de variabilité qui porte souvent sur le nombre chromosomique (Shepard, 1982 ; Karp et al., 1982).

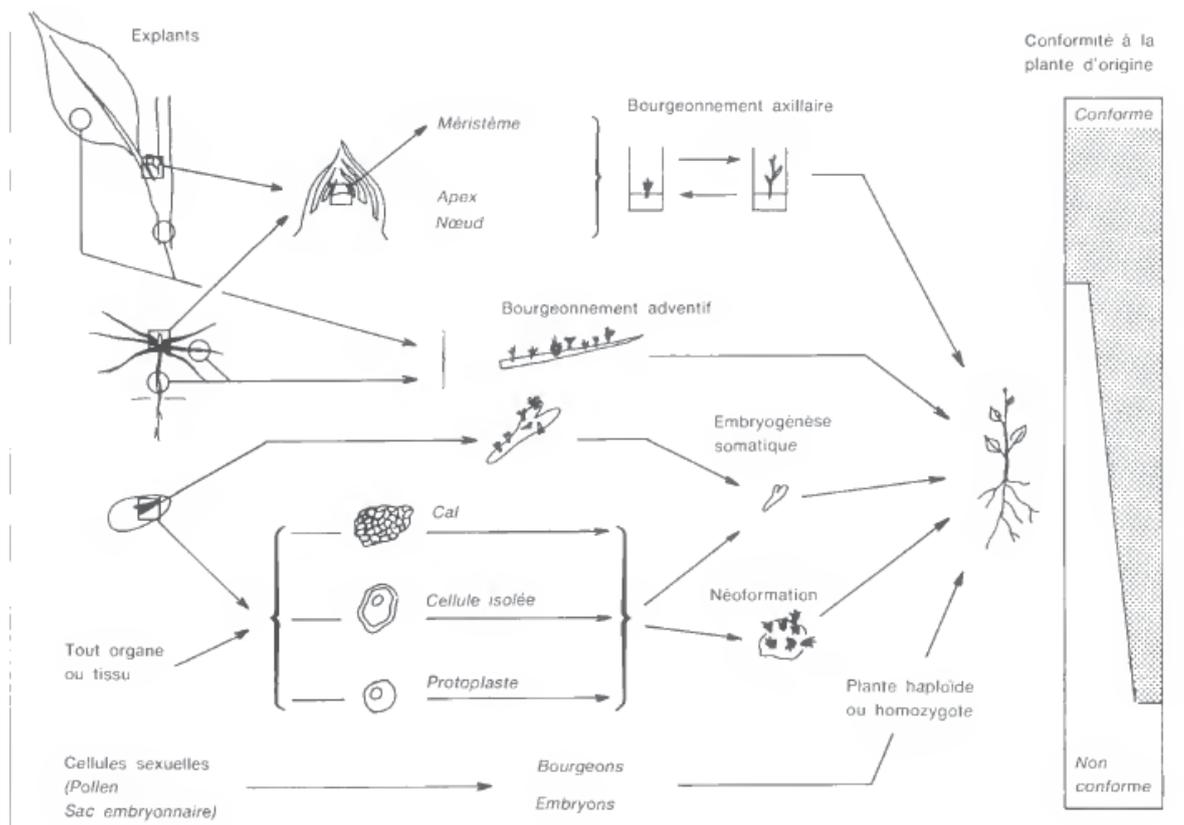


Figure 07 - Les différentes méthodes de culture *in vitro* (Cornu ; Boulay, 1986)

### 2.3. Les facteurs influençant la culture *in-vitro*

L'environnement contrôlé concerne notamment deux paramètres : la température de culture et l'éclairage (intensité et longueur du jour). Ils sont obtenus artificiellement. Leurs valeurs dépendent de l'espèce travaillée ainsi que de la technique utilisée.

#### a. Température

La température est un facteur environnemental qui agit sur la vitesse de croissance et sur le développement des plantes, incluant la transition de la phase végétative à la phase reproductive. Il est connu que les variations de température affectent l'ensemble des réactions biochimiques qui déclenchent ou stimulent la levée de la dormance des graines et des bourgeons axillaires (Kacem, 2005 ; Arditti, 2008).

La température optimale pour la callogenèse de plusieurs plantes se situe entre 20°C et 25 °C (Bhojwani et Razdan, 1996).

#### b. Lumière

La lumière est un facteur déterminant pour la culture *in-vitro* des plantes. Elle a une grande influence de part la durée d'exposition (photopériode), selon Hussey

et Stacey (1981). D'autre part la longueur de jour qui affecte la vigueur et le développement des proliférations et la croissance des cals, cette dernière pourrait aussi contribuer à la formation des cals (Briggs, 1964), de façon général le début de croissance nécessite une faible intensité lumineuse avec 12 à 16 heures de photopériodes (Bommeneni et Jauhar, 2003). Lorsqu'il s'agit de préparer la plantule au rempotage en serre, il apparaît souvent préférable d'augmenter l'intensité de l'éclairage (Margara, 1982).

#### **2.4. Les avantages et les inconvénients de la culture *in-vitro***

La production de plantes *in-vitro* pourrait se substituer à la méthode de micro bouturage avec des avantages suivants :

- ✓ La possibilité de conservation de ressources végétales et faire une banque de géotypes et réaliser ainsi des plantations hors de la période de croissance (Lê et al., 2002) ;
- ✓ L'amélioration des conditions sanitaires par les techniques de cultures *in-vitro* souvent associées à l'éradication des viroses (Sibi, 1981) ;
- ✓ La propagation végétative des espèces qui ne présentent pas ces capacités en conditions classiques (Sibi, 1981) ;
- ✓ La multiplication rapide due à l'augmentation de diffusion cellulaire par ces techniques (Smith et al., 1985 ; Collet et Lê, 1988).

Comme toutes autres techniques, la culture *in-vitro* est entachée par certains inconvénients et rencontre des difficultés telles que :

- ✓ Le problème de contamination dû soit à l'explant, soit à la technique (Cassells, 1987) ;
- ✓ L'exigence d'une main d'œuvre qualifiée ;
- ✓ Le coût excessif des plantes de micropropagation.

### **3. La micropropagation**

#### **3.1. Définition**

La micropropagation consiste en une prolifération des bourgeons axillaires préexistants sur l'explant mère. Ceci offre une grande garantie de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours des repiquages successifs (Zryd, 1988). Ainsi reproduire *in-vitro* une grande quantité de plants identiques au pied-mère, puis à les acclimater, afin de les intégrer dans un système de production traditionnel (Dominique et Gilbert, 2013).

#### **3.2. Les méthodes de micropropagation**

Les techniques de micropropagation empruntent essentiellement deux voies :

- L'une qui utilise des tissus méristématiques (méristème ou apex de tige, bourgeons axillaires ) ( fig08) potentiellement capable de donner suite, au développement normal, d'un individu est appelée microbouturage (Saadi,1991) cette technique est souvent appelée "multiplication conforme" car elle part de méristème préexistant dans les quels , les cellules sont génétiquement très stables (Boxus,1995), l'individu est généralement obtenu en deux étapes successives, d'abord la production de tige ,puis son enracinement .
- L'autre voie, utilise toute sorte tissus différenciés (fragments de tige, de racines, de pétiole, de feuilles, d'embryons matures et immatures, d'hypocotyles, cotylédons...etc) (fig. 08) pour aboutir à la néoformation soit de bourgeons ou de racines, c'est l'organogenèse, soit de structures ressemblant aux embryons zygotiques, c'est l'embryogenèse somatique (Zryd, 1988 ; Margara, 1989).

Figure 08 – Les principales méthodes de micropropagation (Lindsey et Jones, 1989)

#### **a. Cultures de méristèmes**

Les méristèmes qui sont des tissus de formation, en expansion continue, confèrent à la plante une organogenèse permanente chez les végétaux supérieurs. Ils représentent des petits massifs de cellules indifférenciées et conservent la capacité de se diviser activement. Ces zones méristématiques gardent jusqu'à leur mort le caractère juvénile. Elles jouent un rôle capital dans le développement végétal puisqu'elles édifient tous les organes (Camefort, 1977 ; Margara, 1989).

En multipliant le méristème prélevé au sommet d'une plante ou dans le bourgeon axillaire, le plus souvent indemne de maladies. On pourra très rapidement obtenir de nombreuses plantes, toutes semblables du point de vue génétique et débarrassées de maladies dont elles étaient affectées (Sama et al, 1998;).

### **b. Organogenèse**

L'organogenèse est la base fondamentale de la multiplication végétative, laquelle s'appuie toujours sur la formation de méristèmes nouveaux. En partant d'un explant, elle aboutit à la formation d'un nouvel individu par l'élaboration de bourgeons (caulogenèse) ou d'un cal (callogenèse) et de racine (rhizogenèse) (Margara, 1989).

### **Caulogenèse directe**

La caulogenèse désigne à la fois l'initiation et le développement des bourgeons terminaux, axillaires, adventifs ou néoformés sur un cal.

Les bourgeons terminaux dérivent de la gemmule de l'embryon.

- ✓ Les bourgeons axillaires sont produits généralement par les deux ou trois assises cellulaires superficielles de la tige.
- ✓ Les bourgeons adventifs sont formés en des endroits inhabituels. Ils sont formés à partir d'organes différenciés de la plante (entre nœuds, tubercules, racines). Ils peuvent avoir pour origine des massifs cellulaires restés méristématiques ou bien provenir d'une différenciation de certaines cellules (Camefort, 1977).

La régénération implique la formation de bourgeons adventifs par dédifférenciation et redifférenciation, elle exige la stabilité génétique des cultures pour éviter la variation soma-clonale. La formation des bourgeons adventifs directs à partir d'amas méristématiques, les bourgeons peuvent être repiqués pendant quatre ou cinq générations. Les explants sont établis repiqués dans un milieu à haute cytokinine et un niveau inférieur de l'auxine dans le but d'augmenter la production des bourgeons et la prolifération des pousses. Cette étape est répétée dans plusieurs cycles pour augmenter la biomasse des pousses, soit dans l'agar ou des cultures liquides (Ziv et Altman, 2003).

### **Callogenèse indirecte**

La callogenèse est la néoformation d'un cal (prolifération anarchique de cellules plus ou moins différenciées) à partir d'explants tels que des feuilles, tissu cellulaire indifférencié. Cette formation résulte lors du prélèvement de l'explante d'un effet stimulant des substances trophiques (sucres, azote...) ainsi que des régulateurs de croissance. Une auxine est souvent nécessaire à l'induction de la

callogenèse (Peters, 1986). Pour obtenir une différenciation, on transfère le cal dans un autre milieu de culture sur lequel se développera des petits bourgeons (bourgeons néoformés). On peut passer aussi le cal en milieu liquide pour obtenir une suspension cellulaire, les cellules se séparent les unes des autres pour se multiplier plus rapidement (Saadi, 1991).

### **La rhizogénèse**

La rhizogénèse est le phénomène d'organogénèse le plus généralement impliqué dans la multiplication végétative. Elle comporte différentes phases : la dédifférenciation, formation d'amas de cellules méristématiques, différenciation et organisation des amas méristématiques en primordium racinaire qui se développeront en jeunes racines (Boxus, 1995).

Les méristèmes de racines se répartissent en plusieurs catégories selon leurs origines.

- Les racines latérales se forment de manière spontanée sur la racine principale dans les conditions naturelles.

- Les racines adventives sont produites par des organes divers, soit spontanément, soit accidentellement à la suite d'une blessure ou d'une manière provoquée, dans les conditions du bouturage et du marcottage.

- Les racines néoformées, au sein d'un cal, en culture in-vitro, peuvent être considérées comme un cas particulier de méristèmes adventifs (rhizogénèse indirecte) ou l'émission de racines sur un explant dans des endroits inhabituelles (rhizogénèse directe) (Margara, 1982).

#### **c. Embryogénèse somatique**

Les embryons somatiques connaissent les mêmes stades de développement morphologiques que traversent habituellement les embryons zygotiques à savoir : stade globulaire, cordiforme, torpille et cotylédonaire (Egertsdotter et Arnold, 1998). Ils ont une structure chromosomique souvent semblable à celle de la plante-mère dont ils sont issus (Nutri ranchi, 1995). Le critère qui permet de reconnaître un embryon somatique est certainement sa structure bipolaire, qui développe précocement et simultanément un méristème caulinaire et un méristème racinaire (Nutri ranchi, 1990).

L'embryogénèse somatique emprunte deux voies :

La première dite est l'embryogénèse directe où les embryons sont initiés à partir de tissus en absence de prolifération de cal. Ceci se produit à partir des cellules pré-embryogéniques déterminées ou les cellules sont déjà engagées dans un

développement embryogène et ils ont besoins seulement d'être libérées. Elles semblent préexister dans les tissus de certains explants comme les embryons immatures ou les fragments de très jeunes plantes (Saadi, 1991).

La seconde dite est l'embryogenèse somatique indirecte, pour la quelle une prolifération cellulaire est requise. Les cellules embryogènes apparaissent tardivement au sein du cal produit par la réactivation mitotique des cellules différenciées et/ou la prolifération des cambiums obtenus à partir d'explants de type racines, tige ou de feuille (Jullien, 1991 ; Rugkhla et Jones, 1998)). Leurs multiplications aboutissent à la formation de groupes de cellules embryogènes "nodules méristématiques" dispersés, parmi les autres cellules du cal et qui sont généralement de type parenchymateux (Saadi, 1991).

### **3.3. Les factures de la micropropagation**

Les facteurs influant sur la micropropagation in-vitro peuvent être schématiquement répartis en 2 groupes. Le premier représente Les facteurs internes, (ceux liés à la plante) et concerne d'une part le génotype, la nature et l'âge ontogénique de l'explant et d'autre part l'état physiologique de la plante mère sur laquelle, l'explant a été prélevé. Le second réunit les différents facteurs externes qui englobent et les milieux (notamment leur composition chimique et les régulateurs de croissance) et les conditions de cultures.

#### **a. Effet de l'explant**

Pratiquement, n'importent quel organe (bourgeon, racine, feuille, anthère, etc.) ou fragment d'organe (explant), prélevé sur la plante mère, peut être cultivé isolément sur milieu nutritif synthétique, mais le choix de celui-ci est d'une importance primordiale.

- **L'âge physiologique de l'organe**

Généralement dans les cultures in-vitro, les explants les plus jeunes sont plus favorable (embryons immatures, jeunes feuilles, méristèmes etc.) car c'est l'état juvénile qui semble offrir le plus de possibilités de régénération. Les tissus provenant d'embryons qui expriment le plus souvent, d'une manière nette et reproductible, l'aptitude à la régénération (Haggman et al., 1999).

- **La taille de l'explant**

Plus la taille est importante et plus les équilibres endogènes sont déterminants et les conditions extérieures seront influentes. La taille choisie variera selon la nature de l'explant. Si le tissu végétal est de nature organisée, un ensemble assez complet sera nécessaire (soit un nœud, un apex, ou un bourgeon entier) mais dans

le cas d'une structure différenciée ( éléments de feuilles, de tige, de racines ) des fragments de 5 à 10 mm suffiront (Hannweg et al., 1996).

### **b. Influence du génotype**

La plupart des plantes montrent une régénération génotypique spécifique liée à l'espèce. A l'intérieur d'une même espèce, un génotype donne des bourgeons tandis qu'un autre ne peut fournir que des embryons (Auge et al, 1989). Cependant, plusieurs auteurs mentionnent que seulement certains génotypes paraissent posséder la capacité d'induire une embryogenèse somatique. Cette capacité, chez beaucoup d'espèce semble être génotypiquement contrôlée (Dodeman et al., 1997).

### **c. Le milieu de base de culture**

Avec le développement des cultures de tissus, divers milieux de base comprenant des sels inorganiques, des composés organiques (sucres, vitamines et régulateurs de croissances) ont été progressivement utilisés .Certains milieux proposés dans un but donné sont en fait utilisables d'une manière beaucoup plus étendue.

Les milieux de culture sélectionnés doivent être le plus parfaitement adaptés aux besoins nutritifs de la plante soumise à l'étude afin de laisser s'exprimer pleinement son potentiel génétique (Fracaro et Echeverrigaray, 2001).

Les principaux constituants d'un milieu de culture sont généralement représentés par les macro-éléments et les micro-éléments, une source carbonée et azotée, des vitamines et des régulateurs de croissance (DelVesco et Guerra, 2001).

### **La composition chimique**

**Macro-éléments** (g/L): N, P, K, Ca, Mg, S (sous forme de sel) : Les préfixes macro-lorsqu'il est appliqué à des éléments se réfèrent au fait que ces substances sont nécessaires en quantités relativement importantes. Ils incluent le calcium (Ca), magnésium (Mg), l'azote (N), le phosphore (P), potassium (K) et du soufre (S) (Fossard, 1976).

**Micro-éléments** (mg/L) : Al, Cu, Ni, Co, Mo, Mn, I (sous forme de sel) : Les micro-éléments sont nécessaires mais par petites quantités et souvent peuvent laisser dans le milieu des impuretés dans d'autres ingrédients. Ils peuvent également se reportés à l'explantation de tissus et de soutenir leur croissance pendant plusieurs semaines. Les micro-éléments sont essentiels en tant que catalyseurs pour de nombreuses réactions biochimiques. Ils incluent le cobalt (Co), le molybdène (Mo), le manganèse (Mn), le zinc (Zn), le cuivre (Cu) et le bore (B) (Soltner, 2005)

## Les substances organiques

**Source de carbone :** La source de carbone, la plus couramment utilisée, est le saccharose. Le glucose et le fructose sont également connus pour soutenir une bonne croissance de certains tissus (Téoulé, 1999). Le saccharose est nécessaire pour diverses activités métaboliques, pour la différenciation des éléments du xylème et le phloème en culture de cellules (Struik et Wiersema, 1999), joue le rôle de contrer la déficience de la photosynthèse, il est indispensable pour la culture d'embryon immature. (Khuri et Moorby, 1995).

**Vitamines :** les plantes peuvent produire leurs besoins en vitamines. Cependant, les cultures de cellules végétales doivent être complétées avec certaines vitamines. les plus largement utilisés du groupe B (thiamine B1, la niacine B3), la pyridoxine B6) (Saadi, 1991). Certaines autres vitamines qui trouvent des utilisations spécifiques dans les cultures de cellules sont de l'acide pantothénique, la vitamine C, la vitamine D et la vitamine E (Téoulé, 1999 ; Bhojwani et Razdan, 1996).

**Acides aminés :** peuvent être directement utilisés par les cellules végétales ou peuvent servir de source d'azote. Toutefois, une source organique d'azote est préférable quand une source inorganique est absente ou épuisée. La cystéine a été incluse dans le milieu comme un antioxydant pour contrôler l'oxydation de composés phénoliques et éviter le noircissement des tissus. La glycine souvent utilisée a peu d'intérêt à la croissance soutenue de cals et peut-être même un inhibiteur à des niveaux plus élevés (Bhojwani et Razdan, 1996).

## Les régulateurs de croissance (phytohormones)

En plus des éléments nutritifs, il est généralement nécessaire d'ajouter une ou plusieurs substances de croissance, telles que les auxines, cytokinines et gibbérellines (Tab. 02), afin de soutenir une bonne croissance des tissus et des organes. Toutefois, l'exigence de ces substances varie considérablement avec le tissu, et semble dépendre de leurs niveaux endogènes.

Tableau O2 - Les différents facteurs de croissance des plantes et leurs propriétés (Belguendouz, 2011).

Famille	Auxines	Cytokinines	Gibbérellines	Éthylène	Acide abscissique
Exemples	*Acide indole 3-acétique (AIA ou IAA), Acide naphthalèneacétique (ANA), Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)	Zéatine ou N <sup>6</sup> -isoentényladénine, Isopentényladénine (IPA)	Acide gibbérannique GA3, il existe de nombreuses gibbérellines (de GA1 à GA110)	Éthylène (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ou CH <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub> )	Acide abscissique (ABA)
Propriétés	stimulation de la croissance, stimulation de l'élongation cellulaire, régulation de la division et de la différenciation cellulaire, messager des réponses géotropiques et phototropiques, régulation de l'abscission, stimulation de rhizogène adventive	stimulation de la division cellulaire, régulation de la différenciation cellulaire, des bourgeons et des racines grandissement des cellules foliaires, inhibition de la sénescence des feuilles	élongation des entrenœuds (forte stimulation chez les mutants nains), montaison des plantes en rosette, levée de dormance des graines et des bourgeons, régulation de l'utilisation des réserves lors de la germination	perturbation de l'élongation cellulaire, perturbation des réponses géotropiques, accélération de la sénescence foliaire et de la maturation des fruits, stimulation de l'abscission	effet inhibiteur général de la croissance cellulaire, régulation de la dormance des bourgeons et des graines, régulation de l'abscission des feuilles, des fleurs et des fruits, régulation du fonctionnement des stomates en situation de stress
Représentation	 Acide indole 3-acétique	 Zéatine	 GA3	 Éthylène	 Acide abscissique

**Auxines** : L'auxine est synthétisée majoritairement à partir du tryptophane (fig. 09) mais aussi à partir de l'acide chorismique à l'extrémité des tiges (dans l'apex) et dans le méristème des bourgeons terminaux (Anonyme 2007).

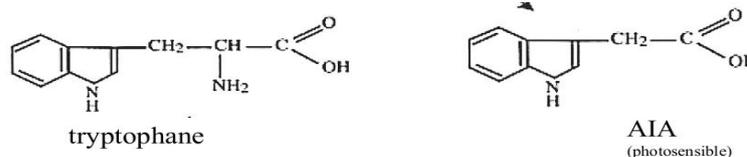


Figure 09 - Structure chimique des auxines naturelles (Anonyme 2007).

La synthèse de l'auxine s'effectue dans les apex méristématiques des tiges et dans les jeunes feuilles des bourgeons terminaux. Le transport de l'auxine s'effectue de façon polarisée, de l'apex vers la base dans la tige. L'action de l'auxine sur l'élongation cellulaire se fait d'une part par augmentation de la plasticité de la paroi, d'autre part par action sur l'activité génique, régulant ainsi la synthèse d'ARN messagers codant pour des protéines nécessaires à l'élongation (Obata-Sasamoto et Suzuki, 1979).

Dans la nature, les hormones de ce groupe sont impliquées dans l'élongation de la tige et de nœuds, le tropisme, la dominance apicale, abscission, enracinement, etc.... . La culture des tissus avec les auxines ont été utilisés pendant la division cellulaire et la différenciation de la racine.

Les auxines couramment utilisées en culture de tissu sont les suivantes : l'acide indole-3-acétique (IAA), l'acide indole-3-butyrique (IBA), l'acide naphthalène acétique (NAA), naphtoxyacétique (ANP), l'acide para-chlorophénoxyacétique (p-CPA), acide dichloro (2,4-D) et acide trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T). Parmi ceux-ci, IBA et IAA sont largement utilisés pour l'enracinement et dans l'interaction avec une cytokine, par la prolifération des pousses. Le 2,4-D et de 2,4,5-T sont très efficace pour l'induction et la croissance des cals. Le 2,4-D est également un important facteur pour l'induction de l'embryogenèse somatique. Les auxines sont généralement dissoutes dans l'éthanol ou de la soude diluée (Bhojwani et Razdan, 1996).

**Cytokinines :** Les cytokinines sont des adénines substituées (fig.10) ; l'adénine (ou 6-aminopurine) est une base purique qui intervient dans la synthèse des acides nucléiques (Bhojwani et Razdan, 1996).

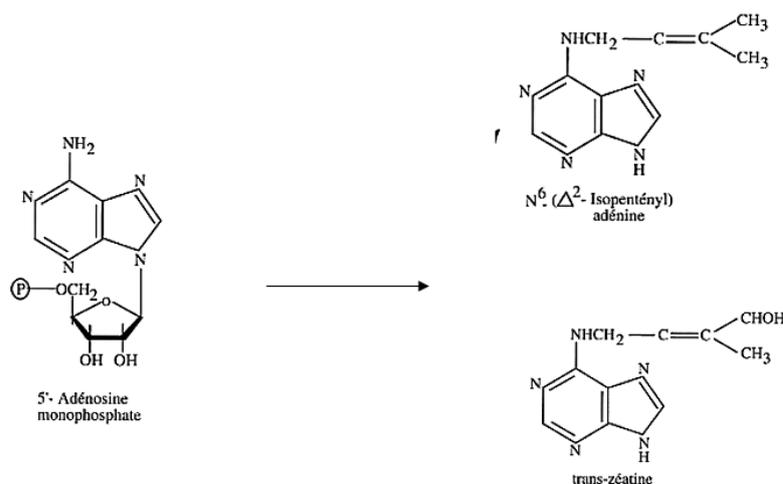


Figure 10- Structure chimique des auxines naturelles (William et Charles, 2003)

Les cytokinines sont incorporés principalement pour la division cellulaire et différenciation des pousses adventives à partir des cals et des organes. Ces

composés sont également utilisés pour la prolifération des pousses par la libération de bourgeons axillaires de la dominance apicale. Les cytokinines plus couramment utilisés sont : benzylamino purine (BAP), isopentényl-adénine (2-IP), furfuryl aminopurine (kinétine), thidiazuron (TDZ) et zéatine. Comparé aux autres cytokinines, thidiazuron est généralement utilisé à des concentrations très faibles. Les cytokinines (Palmer et Smith, 1969).

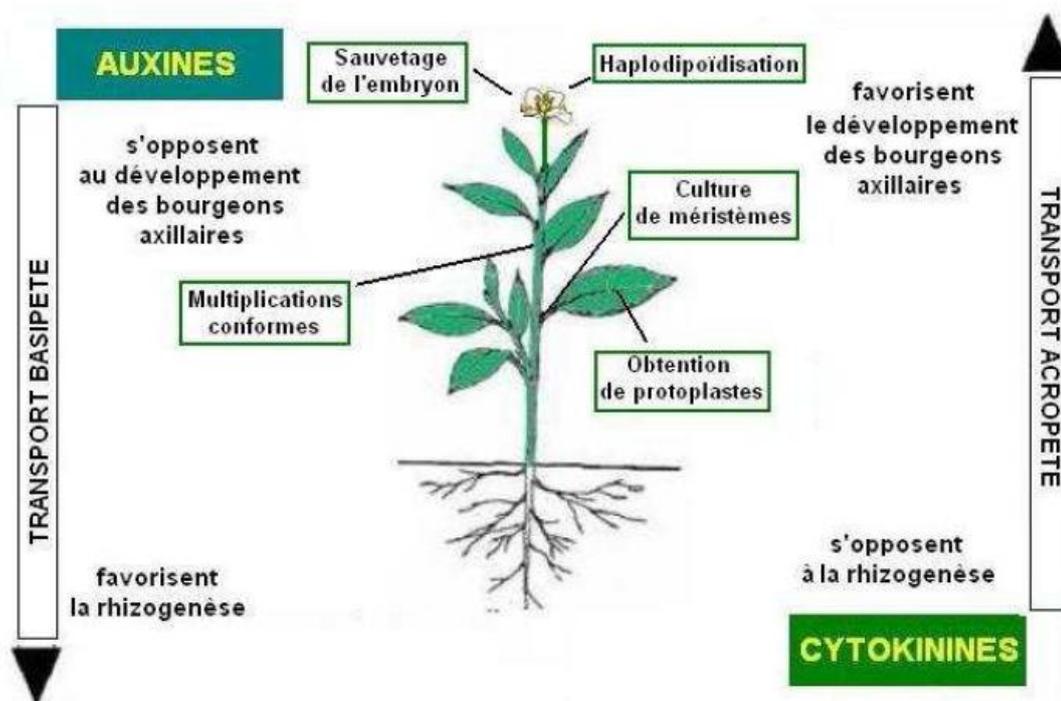


Figure 11 - Rôle des hormones d'auxine et de cytokinine (anonyme 2010)

De fortes concentrations en cytokinines alliées à de faibles concentrations en auxines, elles permettent d'obtenir le développement des bourgeons axillaires ou adventifs et ainsi de multiplier les plantes (Lian et al, 1998).

De fortes concentrations en auxines alliées ou non à de faibles concentrations en cytokinines, elles permettent d'obtenir l'enracinement des tiges feuillées.

On équilibre les concentrations de ces deux hormones, on obtient un cal. (Donnelly et al, 2003)(fig.11).

**Acide gibbérélique (AG3) :** Il y a plus de 20 gibbérélines connues. Parmi celles ci, généralement, AG3 est le plus souvent utilisé. Par rapport aux auxines et cytokinines, les gibbérélines sont utilisées très rarement (Bhojwani et Razdan, 1996). Elles sont signalées comme stimulateurs du développement normal de plante *in-vitro* à partir d'embryons formés adventives. AG3 est facilement soluble

dans l'eau froide. AG3 provoque l'allongement cellulaire et la croissance des entre nœuds (Vreugdenhil et Struik, 1989 ; Okazawa, 1967).

**Acide abscissique (ABA) :** Il est le plus souvent nécessaire pour une croissance normale et développement des embryons somatiques et seulement en sa présence ils ressemblent aux embryons zygotiques. Il est également connu pour promouvoir la morphogenèse dans les cultures de Bégonia (Krauss et Marschner, 1998).

**Éthylène :** Hormone liée ou groupe des auxines, et son action peut être inhibitrice ou activatrice selon les cas. Toutes sortes de cultures de tissus végétaux produisent l'éthylène, et le taux de production augmente dans des conditions de stress. Dans les cultures, l'éthylène est également produit lorsque les constituants organiques du milieu sont soumis à la chaleur, à l'oxydation, la lumière du soleil ou de rayonnement ionisant (Bhojwani et Razdan, 1996).

Chapitre II :  
*Matériel et Méthodes*

## 1. Matériel végétal

Nous avons utilisés au cours de notre expérimentation deux variétés de *Citrus* de la collection d'INRA de Oued Ghir région de Bejaia, afin de déterminer les conditions optimales de stérilisation.

Lors de cette étude, on a utilisé les graines de *Citrus reticulata* pour étudier les conditions de stérilisation des graines. Vu le manque des graines de cette variété qui est dû à la fin de sa saison, on a utilisé les graines de *Citrus limon* pour étudier les conditions d'organogénèse d'explant de *Citrus*.

## 2. Méthodes

### 2.1. Effet de l'hypochlorite de sodium (solution stérilisante) sur la capacité de germination et la croissance des graines de *Citrus reticulata*

#### 2.1.1. Préparation du matériel avant la stérilisation

Les fruits sont lavés abondamment pour destruction tous les micro-organismes après avoir se débarrasser de leur écorce, on récupère les graines puis on les imbibe dans l'eau pendant 24 heures afin de faciliter l'enlèvement du tégument. Sous la hotte, à des conditions stériles, les graines sont débarrassées de leur tégument (Fig. 12).



Figure 12 - Enlèvement de tégument des graines

La stérilisation des graines de *Citrus reticulata* se fait sous la hotte (Fig.13), on stérilise les graines avec l'hypochlorite de sodium à différentes concentrations et à des temps d'exposition de stérilisation différents. Le milieu de culture et les instruments de travail, doit aussi être stérilisé à l'autoclave à une température de 120 °C pendant 20 min de temps.



Figure 13 - Hotte à flux d'air laminaire avec matériels de stérilisation

### **2.1.2. Protocole de stérilisation des graines de *Citrus reticulata***

Après la récupération des graines du fruit, la stérilisation de ces dernières se fait sous la hotte selon le protocole suivant :

- Mettre les graines dans l'éthanol à 70° pendant 30 secondes ;
- Mettre ces graines dans une solution d'hypochlorite de sodium à des concentrations différentes pendant des périodes de temps différentes (quelques minutes) ;
- Rincer avec l'eau stérile 3 à 4 fois pendant 5 minutes chacune ;
- Laisser les graines dans l'eau stérile jusqu'à leurs repiquage dans les tubes.

## **2.2. Effet de milieu de culture et types d'hormones de croissance sur l'organogénèse des explants de citrus limon**

### **2.2.1. Les différents types de milieux de base**

Afin de déterminer les conditions nutritives les plus favorables à la germination des graines et la croissance des plantules de *Citrus reticulata*, nous avons choisi les milieux suivants :

#### **a. Le milieu Murashige et Skoog (MS)**

Les constituants principaux de ce milieu MS, récapitulés au tableau 3, sont l'eau distillée stérile et les sels minéraux qui se répartissent en deux groupes, les macro-éléments (N, P, K, S, Mg et Ca) et micro-éléments (Fe, B, Mn, Zn, Cu, N, Co, Mo et I). La source de carbone est le saccharose. Pour ce milieu, la solidification est réalisée à l'aide de l'Agar.

Tableau 3- Constituants du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962)

	Ingrédients	Solution mère (mg/L)	Volume de prélèvement (mL)
Macro-éléments	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	100
	KNO <sub>3</sub>	1900	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	
Micro-éléments	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22,3	100
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	
	KI	0,83	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	
Fe-EDTA	Na <sub>2</sub> -EDTA	3,73 g/L	5
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,78 g/L	
Sucre	Saccharose	20 g/L	
Agar	Agar	10 g/L	

### b. Le milieu de Rangan (MBR)

Ce milieu est utilisé par Rangan et ses collaborateurs (1969) pour la culture *in-vitro* d'embryons et de nucelles de citrus. Le milieu MBR ne diffère du milieu MS que par la concentration en vitamine B<sub>1</sub> (0,1mg/L), en saccharose (50mg/L) ; il contient en outre, de l'extrait de malte à la concentration de 500mg/l.

### c. Le milieu de martin (BN<sub>0</sub>) et (BN<sub>100</sub>)

Ces milieux utilisés par Martin et al. (1979), sont très voisins du milieu de Murashige et Skoog, ne diffère ce milieu que par la concentration de nitrate d'ammonium et en nitrate de potassium.

	MS (BN <sub>1650</sub> )	BN <sub>100</sub>	BN <sub>0</sub>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (mg/L)	1650	100	0
KNO <sub>3</sub> (mg/L)	1900	2800	2950

## 2.2.2. Les différents types d'hormones de croissance

**a. Préparation de la solution des hormones de croissance :** La préparation de la solution mère à base des hormones s'est effectuée comme suit :

- Peser les régulateurs de croissance nécessaires et les dissoudre dans quelques gouttes de solvant comme l'indique le tableau 4 ;
- Ajouter un volume de l'eau distillée, vérifier l'état de solution et ajouter un peu de solvant au besoin ;

- Transférer la solution dans un flacon et le ranger au réfrigérateur.

Cette solution peut être conservée pour une durée d'un mois au maximum avant sa détérioration.

Tableau 4 - Les différents types d'hormones de croissance et leurs solvants

Hormone	Solvant approprié
2,4D	1N NaOH ou EtOH
AIA	1N NaOH ou EtOH
AIB	1N NaOH ou EtOH
BAP	1N NaOH ou EtOH
KIN	1N NaOH ou EtOH

#### b. Les hormones de croissance utilisées pour l'induction de l'organogénèse des explants de *Citrus limon* :

La plupart des travaux relatifs à l'induction de la callogenèse rapportent l'utilisation du 2,4-D, l'ANA et des cytokinines comme la KIN et le BAP. Pour l'induction de la caulogénèse, on a utilisé les ANA ; AIB et 2,4-D combinaient avec différentes concentrations de BAP (Tab. 5). Seuls les meilleurs résultats sont retenus.

Tableau 5 - Différentes combinaisons hormonales additionnées pour l'induction de la callogenèse ou caulogénèse

Auxine (mg/L)	Cytokinine (mg/L)	
	BAP	Kn
2,4-D	0,5/1	0,1/1
	0,1/1	
	1/1	
ANA	0,1/1	0,1/1
	0,5/1	
	1/1	
AIB	0,1/1	
	0,5/1	
	1/1	

### 2.3. Mise en culture

#### 2.3.1. La germination des graines

Après la stérilisation, les grains cultivés dans les flacons ou les tubes à essai continent de milieu de base MS. Ils sont disposés régulièrement espacés de manière à éviter tout chevauchement des racines pouvant aboutir à une cassure

au moment du transfert. Après une semaine les grains ont été pré-germés à conditions d'obscurité et à une température ambiante de 25°C.

### **2.3.2. Le prélèvement des explants**

Après la germination des graines, on attend que les germes atteignent au moins 3 cm, pour commencer les manipulations.

Le repiquage des explants sur les milieux de culture est effectué à l'aide d'une pince stérilisée et près de la flamme du bec benzène. Les tronçons sont prélevés et plantés à raison d'un par tube, en flambant l'ouverture du tube avant et après l'opération sous la hotte, la fermeture étanche du tube se fait avec du coton cardé et du papier aluminium stérile.

### **2.3.3. Le repiquage des cals**

On procède au repiquage des cals sur un milieu frais, afin d'éviter les nécroses dues à l'épuisement des substances nutritives contenues dans le milieu. La fréquence des repiquages est généralement de 4 semaines pour les transferts.

## **3. Analyse statistique des résultats**

L'analyse statistique a porté sur la comparaison des différents traitements à l'aide d'une analyse de variance par le logiciel Excel stat (2009.1.02), suivie d'une comparaison des moyennes (Test de SNK), et cela pour les trois facteurs (concentration ; temps ; tégument). Cette analyse est portée sur l'ensemble des paramètres mesurés lors de la micropropagation. Les résultats obtenus sont ensuite représentés sous forme de graphes en fonction des variétés et cela à l'aide du logiciel EXCEL.

Chapitre III :  
*Résultats et  
Discussion*

## 1. Effet de stérilisation des graines sur la germination

### 1.1. Résultats et interprétation

La stérilisation du matériel végétal, avant la mise en culture des graines, est une étape délicate. Les substances stérilisantes utilisées doivent avoir un double effet, afin d'éviter :

- L'infection des tissus due à la propagation des bactéries et des champignons ;
- Le traumatisme des tissus qui pourrait conduire à leur nécrose et à la mort (Saidi, 2009).

Dans cette première partie d'expérimentation, on a testé trois facteurs : la concentration du détergent ; le temps de stérilisation et la présence/absence de tégument pour déterminer les taux de : germination, contamination et nécrose.

#### 1.1.1. Effet du détergent sur le taux de germination

Nous avons retenu l'hypochlorite de sodium (NaClO) comme agent désinfectant avec différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 5 et 10) à des temps d'exposition au détergent (1 ; 5 et 10min) dans le but d'optimiser le meilleur barème de stérilisation des graines de *citrus reticulata* avec ou sans tégument cultivée sur le milieu de base culture MS sans hormone de croissance.

##### 1.1.1.1. Effet de la concentration de détergent (NaClO) sur le taux de germination des graines de *citrus reticulata* sans tégument à différents temps d'exposition au détergent

La figure 14 montre que le taux de germination des graines de *citrus reticulata* sans tégument est observé avec la concentration NaClO (0,5) quelque soit le temps d'exposition au détergent. L'allure du graphe nous indique que ce taux de germination diminue pour atteindre un minima de 0% pour la concentration NaClO de (1%) d'un temps de 5 min, de 0% pour la concentration NaClO de (5%) à un temps de 1 min. tandis qu'il est à 10% pour la concentration NaClO de (1%) à un temps de 10min. après cette réduction, on peut noter que le taux germination augmente à nouveau pour atteindre des concentrations importantes de NaClO (10%) pour les temps 5min et 10min à 60% et 40% respectivement. Nous avons remarqués que les tests avec la concentration (10%) de NaClO à des temps 10min et 5min sont plus efficaces pour la stérilisation des graines de *citrus reticulata* a cause de pourcentage élevé de germination.

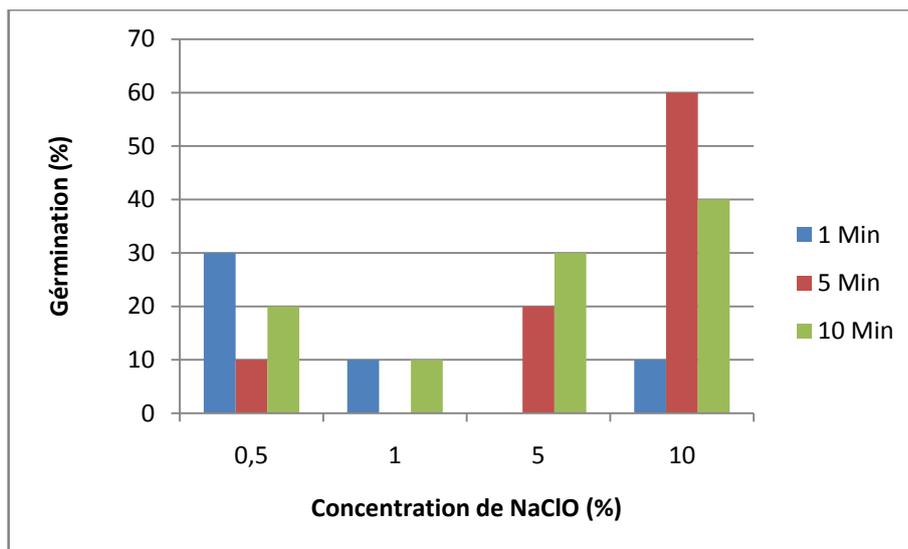


Figure 14 - Le taux de germination des graines de *citrus reticulata* sans tégument en fonction de la (NaClO) à différents temps d'exposition au détergent (1min, 5min, 10min).

#### 1.1.1.2. Effet de la concentration de détergent sur le taux de germination des graines de *citrus reticulata* avec tégument à différents temps d'exposition au détergent

La figure 15 montre que le taux de germination des graines de *citrus reticulata* avec le tégument est nulle à concentration NaClO de (0,5%) pour des temps de 1 et 5 min, mais il est de 10% pour un temps de 10min qui reste constant avec les concentration NaClO de (1%) et (5%) et elle atteint un maximum avec la concentration NaClO (10%) pour un taux de germination de 30%, on observe aussi qu'à faible temps de 1min et 5min le taux de germination est le même pour les différentes concentrations avec une variation en fonction de la concentration. Nous avons remarqués que les tests avec la concentration (10%) de NaClO à des temps 10min et 5min sont plus efficaces pour la stérilisation des graines de *citrus reticulata* a cause du pourcentage élevé de germination.

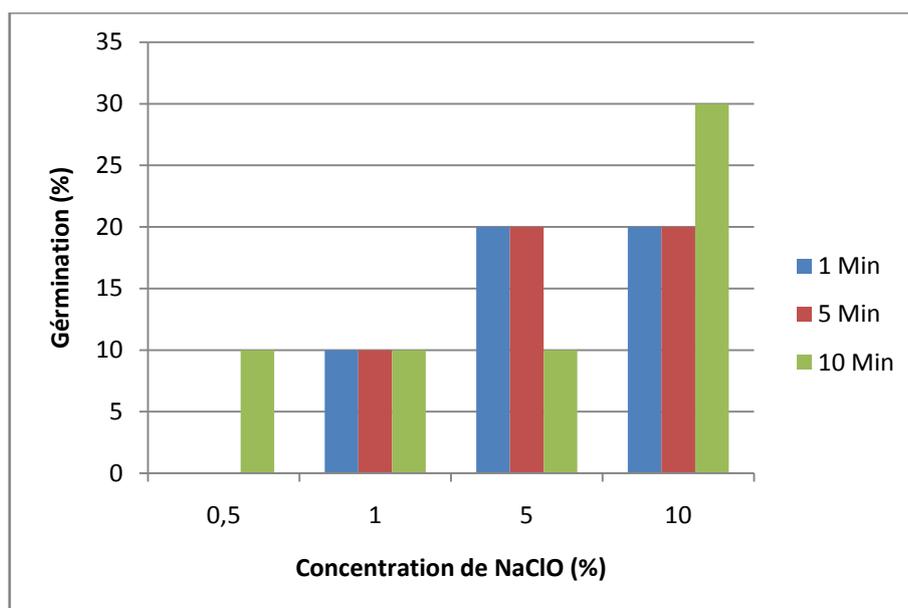


Figure 15 - Le taux de germination des graines de *citrus reticulata* avec tégument en fonction de la (NaClO) à différents temps d'exposition au détergent (1min, 5min, 10min).

### 1.1.1.3. Analyse multi-variance de taux de germination

La variation de la germination des graines de *citrus reticulata*, en fonction de concentration de NaClO a différents temps d'exposition au détergent en présence ou absence de tégument, est illustrée sur les figures 14 et 15. On a constaté que le taux de germination dépend de la concentration du détergent utilisé à différents temps de d'exposition pour la stérilisation des graines et l'analyse de la variance pour la concentration de NaClO et le temps d'exposition au détergent indique un effet significatif ( $p=0,038$ ) et ( $p=0,001$ ) sur le taux de germination. Ainsi elle est plus ou moins grand pour les graines sans tégument (N) par rapport les graines avec tégument (T). L'analyse de la variance pour la stérilisation avec ou sans tégument montre un effet significatif ( $p=0,041$ ) sur la germination (Tab. 06).

Tableau 06 - Analyse de la variance du taux de germination en fonction de concentration ; temps et de tégument.

Source	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Concentration	1313,333	262,667	2,946	0,038
Temps (min)	2423,333	605,833	6,794	0,001
Tégument	426,667	426,667	4,785	0,041
Concentration*Temps (min)	1636,667	81,833	0,918	0,575
Concentration*Tégument	233,333	46,667	0,523	0,756
Temps (min)*Tégument	356,667	89,167	1,000	0,431

### 1.1.2. Effet du détergent sur le taux de contamination

Nous avons retenu l'hypochlorite de sodium (NaClO) comme agent désinfectant avec différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 5 et 10) à des temps d'exposition au détergent (1 ; 5 et 10min) dans le but d'optimiser le meilleur barème de stérilisation des graines de *citrus reticulata* avec ou sans tégument cultivée sur le milieu de base culture MS sans hormone de croissance.

#### 1.1.2.1. Effet de la concentration de détergent à différents temps d'exposition au détergent sur le taux de contamination des graines de *citrus reticulata* sans tégument

La figure 16 montre que le taux de contamination des graines de *citrus reticulata* sans tégument est maximum, il est de 70% pour une concentration NaClO de (0,5%) à un temps de 5min, ce test avéré inefficace, puis il diminue pour atteindre un minimum pour la concentration NaClO (10%), contrairement au temps de 1 min ou il est minimal avec la concentration NaClO (0,5%) puis il augmente pour atteindre un maximum avec la concentration NaClO (10%). Le taux de contamination pour le temps de 10min varie entre 10% et 20% pour les différentes concentrations. Nous avons remarqués que les tests avec la concentration (10%) de NaClO à des temps 10min et 5min sont plus efficaces pour la stérilisation des graines de *citrus reticulata* à cause de pourcentage faible de contaminations.

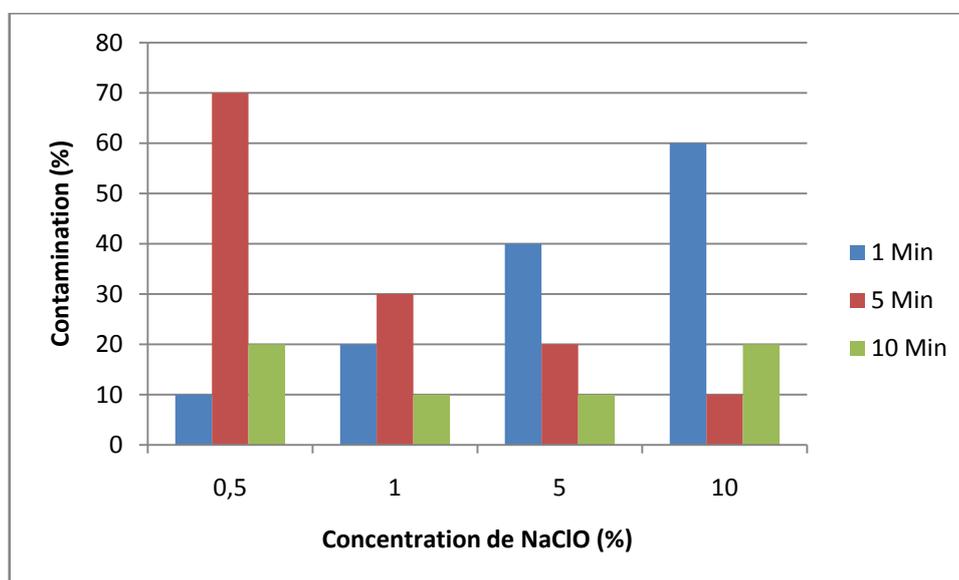


Figure 16 - Le taux de contamination des graines de *citrus reticulata* sans tégument en fonction de la (NaClO) à différents temps d'exposition au détergent (1min, 5min, 10min).

### 1.1.2.2. Effet de la concentration de détergent à différents temps d'exposition au détergent sur le taux de contamination des graines de *citrus reticulata* avec tégument

La figure 17 montre que le taux de contamination des graines de *citrus reticulata* avec tégument est maximum, il est de 70% pour une concentration NaClO de (1%) à un temps de 1min, et de 50% et 40% pour les temps 5 min et 10min respectivement avec la même concentration, ces tests avérés inefficaces. Puis, il diminue pour atteindre un minimum de 10% pour une concentration NaClO (10%) à des temps 5min et 10min, contrairement au temps de 1min où il reste constant à 40% pour les concentrations 5% 10% de NaClO. Le taux de contamination pour la concentration NaClO (0,5%) est varié on fonction de temps d'exposition au détergent. Nous avons remarqués que les tests avec la concentration (10%) de NaClO à des temps 10min et 5min sont plus efficaces pour la stérilisation des graines de *citrus reticulata* a cause de pourcentage faible de contaminations.

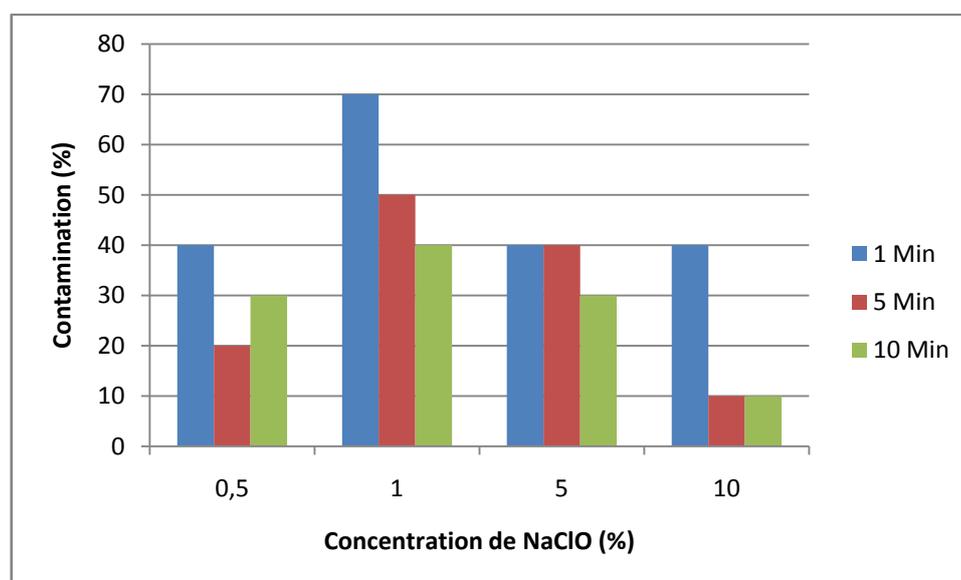


Figure 17 - Le taux de contamination des graines de *citrus reticulata* avec tégument en fonction de la (NaClO) à différents temps d'exposition au détergent (1min, 5min, 10min).

### 1.1.2.3. Analyse multi-variance de taux de contamination des graines de *citrus reticulata*

La variation de la contamination des graines de *citrus reticulata* en fonction de concentration de NaClO différents temps d'exposition au détergent en présence ou absence de tégument, est montrée sur les figures 16 et 17. On a constate que le taux de contamination ne dépend pas de la concentration du détergent utilisé pour la stérilisation des graines. L'analyse de la variance pour la concentration de NaClO indique un effet non significatif ( $p=0,348$ ), mais un effet significatif

( $p=0,019$ ) pour le temps d'exposition au détergent (Tab. 07). L'analyse de la variance pour la stérilisation avec ou sans tégument indique un effet non significatif ( $p=0,270$ ) sur la contamination (Tab. 07).

Tableau 07 - Analyse de la variance du taux de contamination en fonction de la concentration, temps et de tégument.

Source	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Concentration	2235,000	447,000	1,194	0,348
Temps (min)	5656,667	1414,167	3,776	0,019
Tégument	481,667	481,667	1,286	0,270
Concentration*Temps (min)	8323,333	416,167	1,111	0,408
Concentration*Tégument	2768,333	553,667	1,478	0,241
Temps (min)*Tégument	10,000	2,500	0,007	1,000

### 1.1.3. Effet du détergent sur le taux de nécrose

Nous avons retenu l'hypochlorite de sodium (NaClO) comme agent désinfectant avec différentes concentrations (0,5 ; 1 ; 5 et 10) à des temps d'exposition au détergent (1 ; 5 et 10min) dans le but d'optimiser le meilleur barème de stérilisation des graines de *citrus reticulata* avec ou sans tégument cultivée sur le milieu de base culture MS sans hormone de croissance.

#### 1.1.3.1. Effet de la concentration de détergent à différents temps d'exposition au détergent sur le taux de nécrose des graines de *citrus reticulata* sans tégument

Les résultats, résumés à la figure 18, montrent que le taux de nécrose des graines de *citrus reticulata* sans tégument est maximum, de 80% pendant 10 min, pour une concentration NaClO de (1%) et de 70% pour les temps de 1min et 5min puis il diminue avec la concentration NaClO de (10%) pour atteindre un minimum 40 % pour le temps 10min et de 30% pour les temps 1min et 5min. Le taux de nécrose le plus faible est de 20%, il est obtenu avec la concentration NaClO de (0,5%) pendant un temps de 5 min. A noter aussi qu'à la concentration 5% ; le temps d'exposition au détergent n'a pas d'effet sur la nécrose.

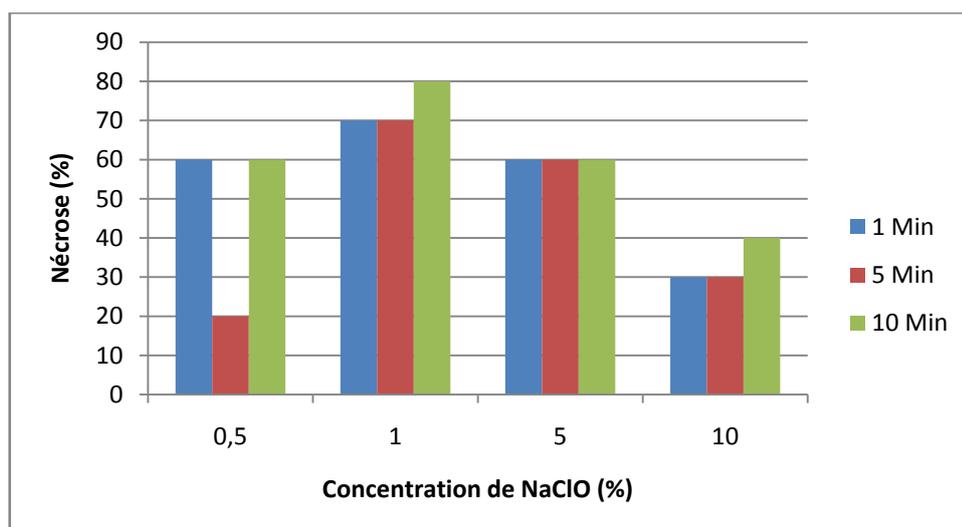
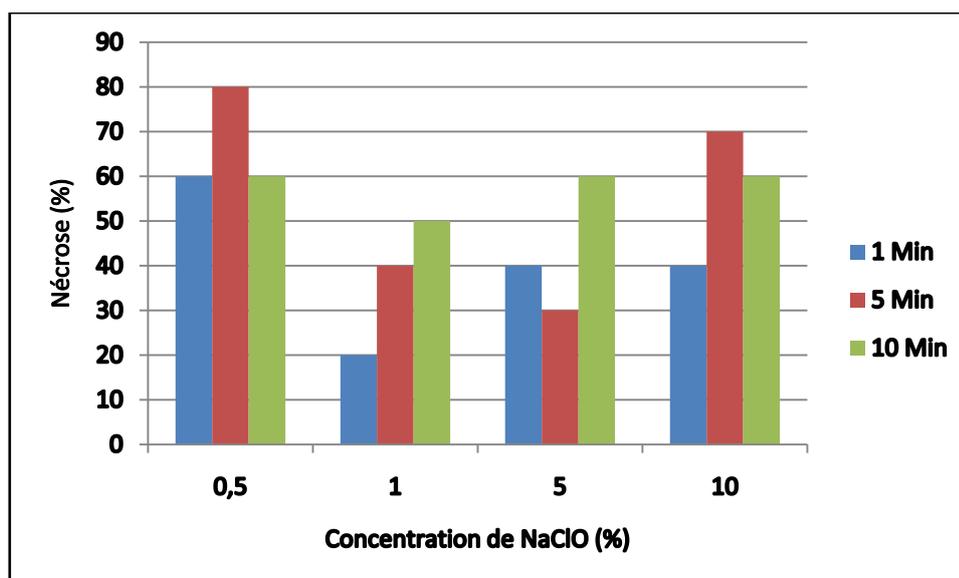


Figure 18 - Le taux de nécrose des graines de *citrus reticulata* sans tégument en fonction de la (NaClO) à différents temps d'exposition au détergent

#### 1.1.3.2. Effet de la concentration de détergent à différent temps d'exposition au détergent sur le taux de nécrose des graines de *citrus réticulata* avec tégument

Les résultats, figure 19, montrent que les taux de nécrose des graines de *citrus reticulata* avec tégument les plus importantes sont observées avec la concentration NaClO de (0,5%) quelque soit le temps d'exposition au détergent. L'allure de graphe montre que le taux de nécrose est plus faible pour le temps 1min et 10min avec la concentration NaClO de (1%) tandis que celui de 5min est obtenu avec la concentration NaClO de (5%) et après le taux de nécrose augmente à nouveau.



**Figure 19** - Le taux de nécrose des graines de *citrus reticulata* avec tégument en fonction de la concentration de NaClO à différents temps d'exposition au détergent

### 1.1.3.3. Analyse multi-variance de taux de nécrose des graines de *Citrus reticulata*

La variation de nécrose des graines de *Citrus reticulata* en fonction de concentration de NaClO différents temps d'exposition au détergent en présence ou absence de tégument, est montrée sur les figures 18 et 19. On remarque que le taux de nécrose ne dépend pas de la concentration du détergent, ni de temps d'exposition, ni en présence ou absence de tégument. Le tableau de l'ANOVA (Tab 08) montre que la concentration de NaOCl n'a aucun effet significatif ( $p=0,615$ ) et ne dépend pas du temps utilisé pour la stérilisation des graines ( $p=0,377$ ). Pour la stérilisation avec ou sans tégument indique un effet non significatif sur la nécrose ( $p=0,951$ ).

Tableau 08 - Analyse de la variance du taux de nécrose en fonction de la concentration, temps et de tégument.

Source	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Concentration	1528,333	305,667	0,721	0,615
Temps (min)	1893,333	473,333	1,116	0,377
Tégument	1,667	1,667	0,004	0,951
Concentration*Temps (min)	8146,667	407,333	0,961	0,535
Concentration*Tégument	3328,333	665,667	1,570	0,214
Temps (min)*Tégument	440,000	110,000	0,259	0,900

## 1.2. Discussion

Les tests réalisés dans les essais sur les différentes concentrations du détergent nous ont permis de constater que la concentration de l'hypochlorite de sodium (NaClO) à 10% présente les meilleurs résultats de stérilisation des graines de mandarine (*citrus reticulata*) avec un taux de germination le plus élevé en moyenne de 22% et un taux de contamination le plus faible en moyenne de 24%.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Mumatz et Akhtar (2003) utilisant l'hypochlorite de sodium à 10% pour désinfecter les graines d'orange (*citrus sinensis*) en présence ou absence du tégument. Ils ont obtenu un taux de germination en moyenne de 48,91%.

Des travaux de Chayanika et al. (2011), réalisés sur la germination des graines du *citrus reticulata*, même espèce étudiée au cours de nos travaux, utilisant l'hypochlorite de sodium (NaClO) pour désinfecte les graines, affirment que les graines germaient à partir de la première semaine de culture et le pourcentage de germination obtenu était de 70%.

Brenes Hines et al (2002). Signalent que la désinfection de L'orange (*Citrus sinensis*) avec L'hypochlorite de sodium (NaClO) à 5% a donne un taux de germination élevé de 83,3% et un taux faible de contamination de 16,7 %

Les meilleurs résultats ont été obtenus pendant un temps de stérilisation de 10min avec un taux de germination le plus élevé en moyenne de 20% et un taux de contamination le plus faible estimé à 15,83%. Ces deux taux sont significatifs avec le temps ce qui confirme leur l'effet sur la stérilisation.

Les travaux menés par Ali et Mirza (2006), sur la stérilisation du matériel végétal pour identifier les conditions idéales de stérilisation de surface des graines de citron(*citrus limon*), ont montré que la contamination maximale était de 55% observée sur l'hypochlorite de sodium à 1% pour 20 minutes, par contre elle était moins sur l'hypochlorite de sodium à 0,5% pendant 10 minutes estime à 40%.

La meilleure germination a été obtenue en absence du tégument tandis que la concentration du détergent et le temps de stérilisation ainsi que la contamination et la nécrose des graines ne dépendent pas de présence ou absence du tégument car il y a l'effet d'autres facteurs tel que la morphologie des graines ; la manipulation, etc....

L'effet de tégument sur la germination des graines a déjà été reconnu par plusieurs auteurs. Niedz (2008) a montré que pour favoriser la germination de graines de l'orange (*citrus sinensis*), le tégument de graines doit être enlevé pour que l'embryon puisse obtenir suffisamment de nutriments pendant un temps relativement court et par conséquent la formation de pousses des graines. Les

travaux de Fazle Azim (2011) affirment que le taux de germination des graines de *citrus sinensis* sans tégument est estimé à 70% tandis que celui des graines avec tégument est évalué à 36%.

## 2. Influence des conditions de culture sur la germination et la croissance des graines de *Citrus reticulata*

### 2.1. Influence de la température sur la germination des graines de *citrus reticulata*

Dans notre travail, des graines ont été cultivées dans un milieu MS à des températures différentes 5°C, 16°C, 25°C et 30°C. Le suivi de la germination des graines sans tégument de *citrus reticulata* sur le milieu MS pour des conditions de stérilisation optimal à concentration 10% d'hypochlorite et à temps d'exposition au détergent 10 min, la figure 20 a montré que la température est plus favorable sur le milieu cultivé à 25°C avec un taux de 75% que celle à 30°C qui présente un taux de 25% et échouée dans les autres milieux cultivés à des températures de 5°C et 16°C.

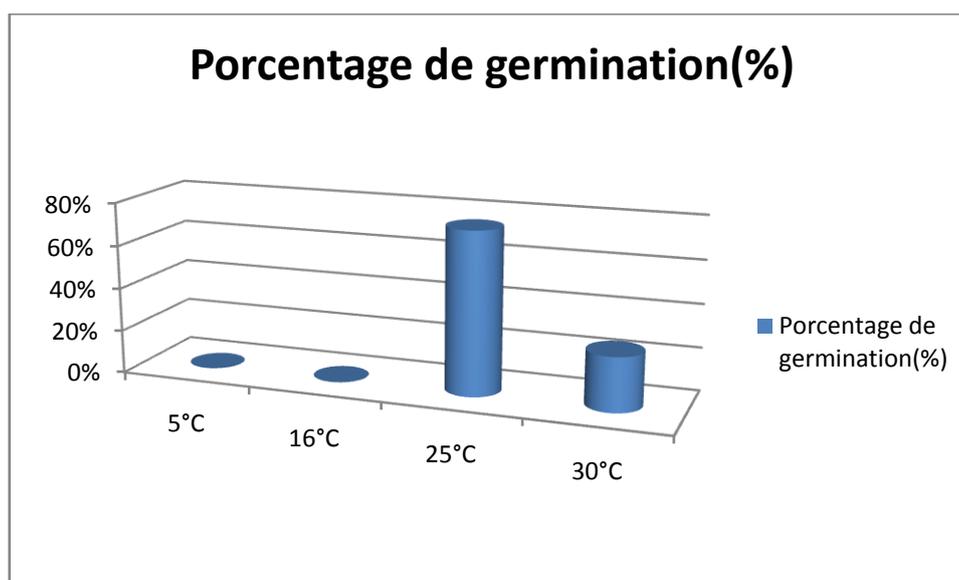


Figure 20 - Influence de la température sur le taux de germination des graines de *citrus reticulata*

D'après ces résultats, on constate que la germination des *citrus* est favorable à des températures ambiantes telles que de 25°C.

Hassanen et al. (2003) ont constaté que le taux de germination des graines de la mandarine (*citrus reticulata*) est influencé par la température à 25°C et selon les travaux de Purvis et Albrigo (1984) rapportent que le taux et la vitesse de germination des pamplemousses (*citrus maxima*) sont favorables à la température.

Les travaux de Ali et Mirza (2006) sur les graines de citron (*citrus limon*), ont montré que l'incubation des graines à des températures de 27°C et 25°C, elles donnent la capacité de germination entre 75-80%

A noter que Rouse et Sherrod (1996), a calculé le pourcentage de germination pour 17 variétés de *Citrus* et constatent que la température optimale est près de 30°C.

## 2.2. Influence de la durée d'exposition à l'obscurité sur la germination et la croissance des graines *Citrus reticulata*

Dans le but de déterminer l'effet de la durée d'exposition à l'obscurité sur la germination et la croissance des graines de *citrus reticulata* sur le milieu MS pour des conditions de stérilisation optimale à concentration 10% d'hypochlorite et à temps d'exposition au détergent 10 min et à condition de culture de température 25°C, a été suivie pendant 4 semaines les résultats obtenus sont dans (figure 21).

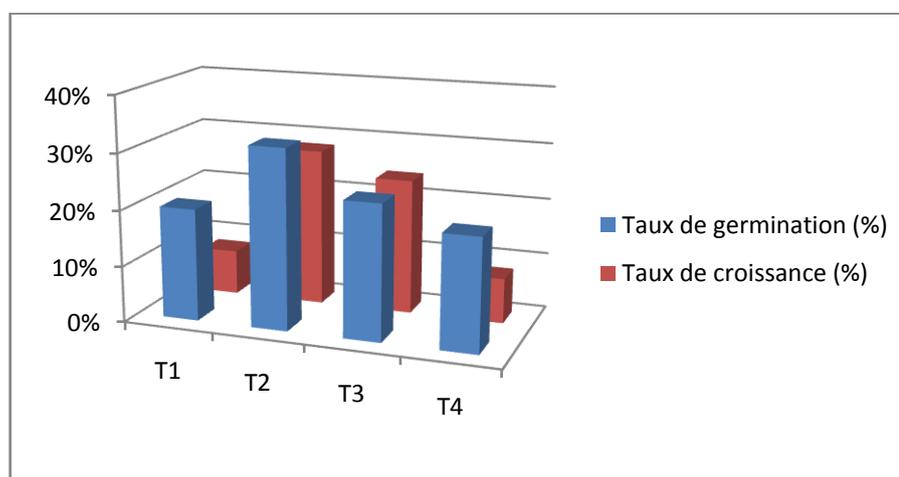


Figure 21 – Taux de germination et de croissance des graines de *citrus reticulata* en fonction du durée d'obscurité (avec : T<sub>0</sub> : une semaine dans la lumière ; T<sub>1</sub> : 1<sup>ère</sup> semaine d'obscurité ; T<sub>2</sub> : 2<sup>ème</sup> semaine d'obscurité ; T<sub>3</sub> : 3<sup>ème</sup> semaine d'obscurité ; T<sub>4</sub> : 4<sup>ème</sup> semaine d'obscurité).

La figure 21 montre que la germination dans l'obscurité on moyenne a été 42% pendant tous les 4 semaines par contre a été 0% pendant une semaine dans la lumière. Pour une durée d'une semaine (planche 1-a), le taux de croissance est estimé à 8% et la morphologie des plantules montre l'apparition de racines et de petites feuilles ainsi qu'un allongement de la tige. Les graines cultivées pendant 2 semaines (planche 1-b) et 3 semaines (planche 1-c) dans l'obscurité ont développé de grandes feuilles avec un allongement de racines et une tige plus foncée et un taux de croissance évalué respectivement 28% et 20%.

L'étude à 4 semaines (planche 1-d), ne présente que 8% de taux de croissance. On conclue que la croissance des plantules est favorisée par l'obscurité, puisque les meilleurs taux ont obtenus après de 2 à 3 semaines d'absence de lumière.

Des résultats ont été réalisés sur la même l'espèce rapportés par Siwach et al. (2012). lorsque les graines de mandarine (*citrus reticulata*) cultivées sur un milieu de MS dans des conditions d'obscurité complet pendant 10 jours, la fréquence de germination est plus élevée comparativement à la culture dans des conditions de la photopériode.

Al –TAHA et al (2012). Ont rapporté que, lorsque les graines de l'orange (*citrus sinensis*) incubent dans l'obscurité pendent 3 semaines, la germination obtenue à 100%.

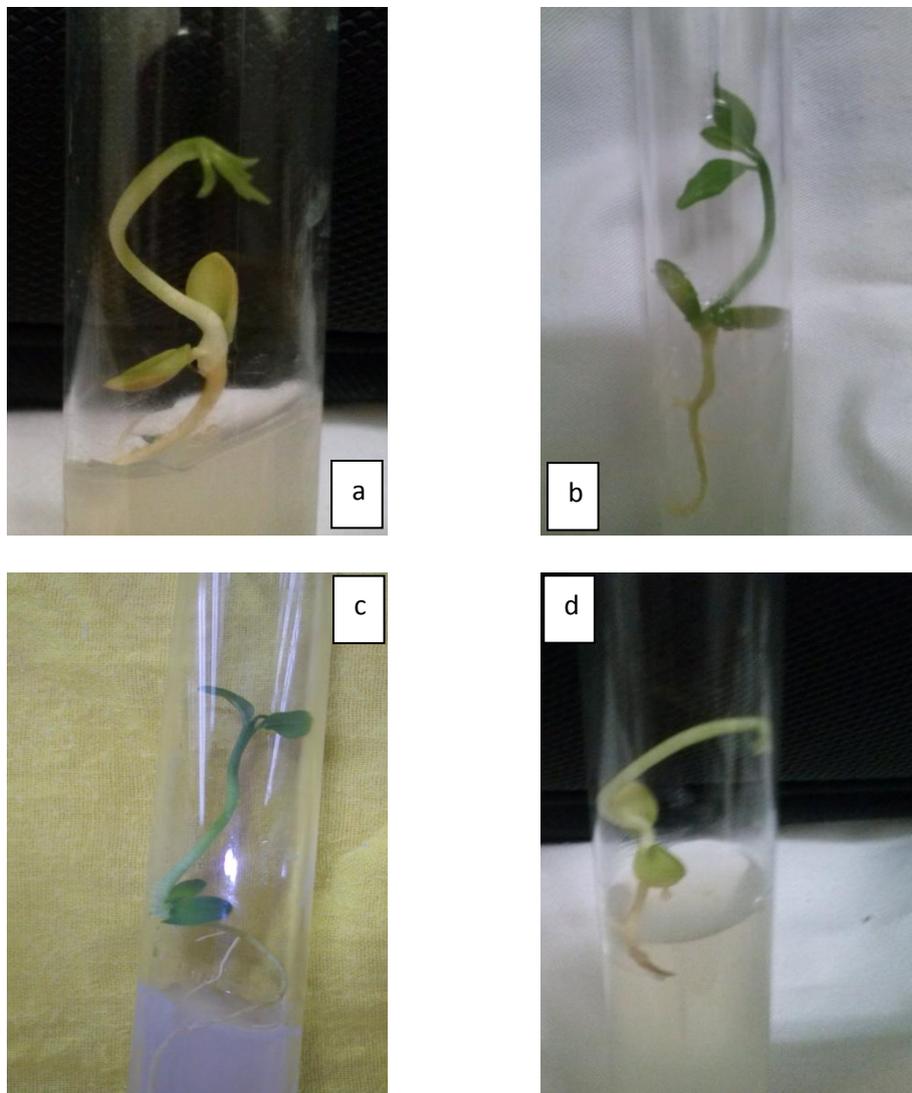


Planche 1 – Influence de l'obscurité sur la croissance des plantules de *citrus reticulata*

- a- une semaine dans l'obscurité : début d'allongement de la racine, la tige de couleur jaune, début d'apparition de la 1<sup>ère</sup> paire de feuilles.
- b- deux semaines dans l'obscurité : développement de la 1<sup>ère</sup> paire de feuilles et sortie de la 2<sup>ème</sup> paire de feuilles, allongement et enroulement de la racine principale et verdissement de la tige.
- c- trois semaines dans l'obscurité : développement de la 1<sup>ère</sup> paire de feuilles, allongement et enroulement de la racine principale et développement d'un chevelu racinaire, verdissement de la tige.
- d- quatre semaines dans l'obscurité : allongement de la racine, la tige de couleur jaune, début d'apparition de la 1<sup>ère</sup> paire de feuilles.

### **2.3. Influence de tégument sur la germination et la croissance des graines de *Citrus reticulata***

L'effet de tégument sur le temps de germination et la croissance des graines de *Citrus reticulata* a été étudié sur le milieu MS pour les conditions de stérilisation 10% (NaClO) et de temps d'exposition au détergent 10min à condition de culture 25°C et de 2 semaines d'obscurité a été étudié.

La germination des graines de *Citrus reticulata* sans tégument est plus rapidement avec un temps de latence de 4 jours alors que la germination des graines avec tégument est très lente avec un temps de latence de 20 jours (planches 2-e et 2-d), l'apparition de la racine pendant les premiers jours pour les graines sans tégument (planche 2-b) et après deux semaines elle commencée la croissance, ouverture de la première paire de feuilles et un allongement des racines (planche 2-c). Par contre, l'apparition de la racine après 20 jours pour les graines avec tégument (planche 2-e) et après deux mois la croissance a été commencée par l'apparition de la première paire de feuilles et des autres parties de la plantule (planche 2-f).

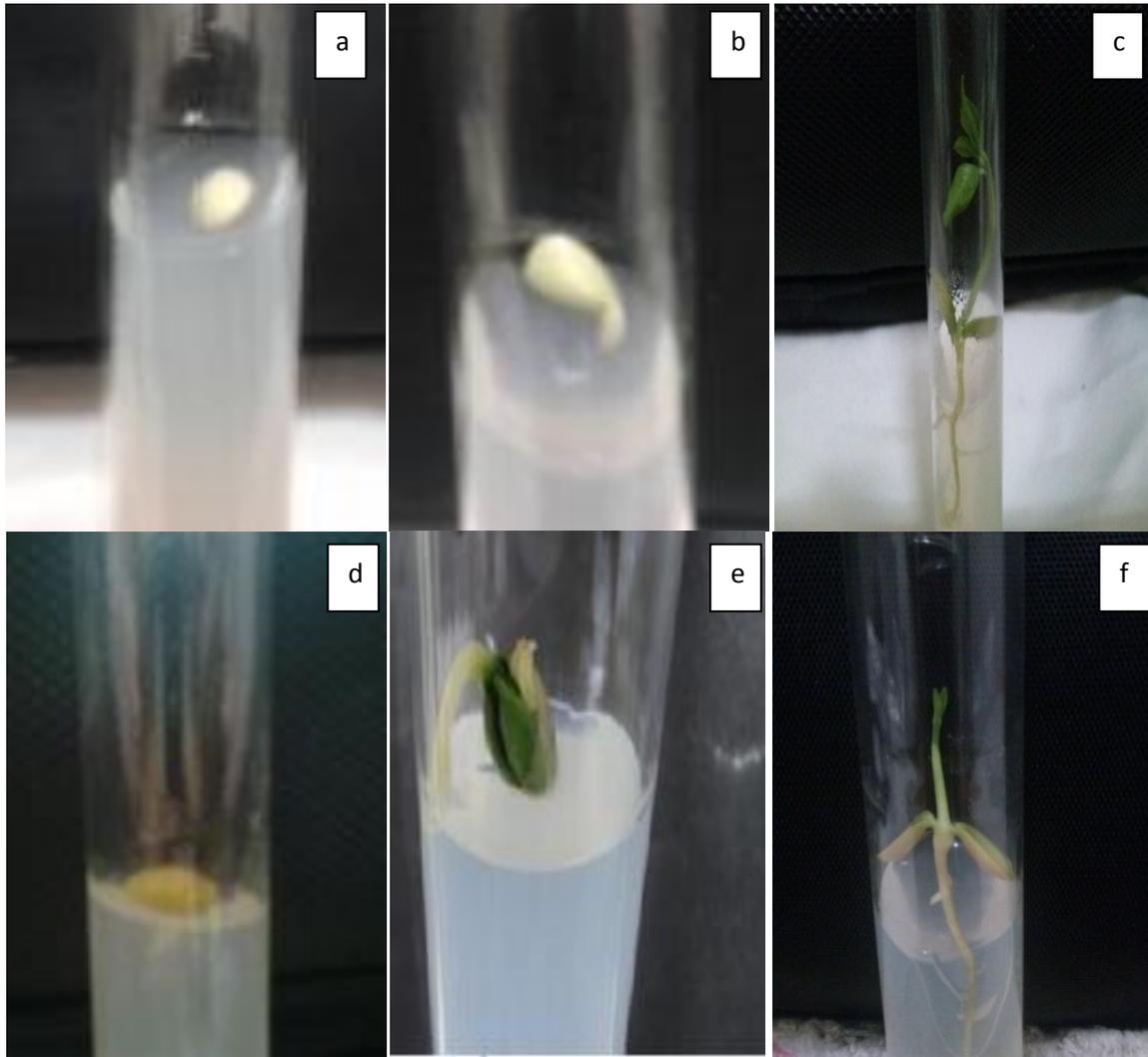


Planche 2 – Influence de présence/absence du tégument sur la germination de *Citrus reticulata*

- a. Etat initial Graine sans tégument ;
- b. Graine sans tégument germe après 4 jours de culture, apparition de la racine ;
- c. Ouverture de la première paire de feuilles et un allongement des racines, après deux semaines de culture ;
- d. Etat initial Graine avec tégument ;
- e. Graine avec tégument germe après 20 jours de culture, l'apparition de la racine ;
- f. Apparition de la première paire de feuilles et un allongement des racines, après deux mois de culture.

## 2.4. Influence du milieu de base sur la germination des graines

Nous utilisons cinq types de milieux afin de déterminer le milieu le plus adéquat pour la germination des graines de *citrus reticulata* pour les conditions de stérilisation 10% (NaClO) et de temps d'exposition au détergent 10min à condition de culture 25°C et de 2 semaines d'obscurité a été étudié.

Dans cette étude, on mesure la capacité de germination qui présente le pourcentage maximal de graines capables de germer dans des conditions expérimentales ainsi que le temps de latence définissant le temps nécessaire pour que les premières graines germent, les résultats obtenues sur (fig. 22).

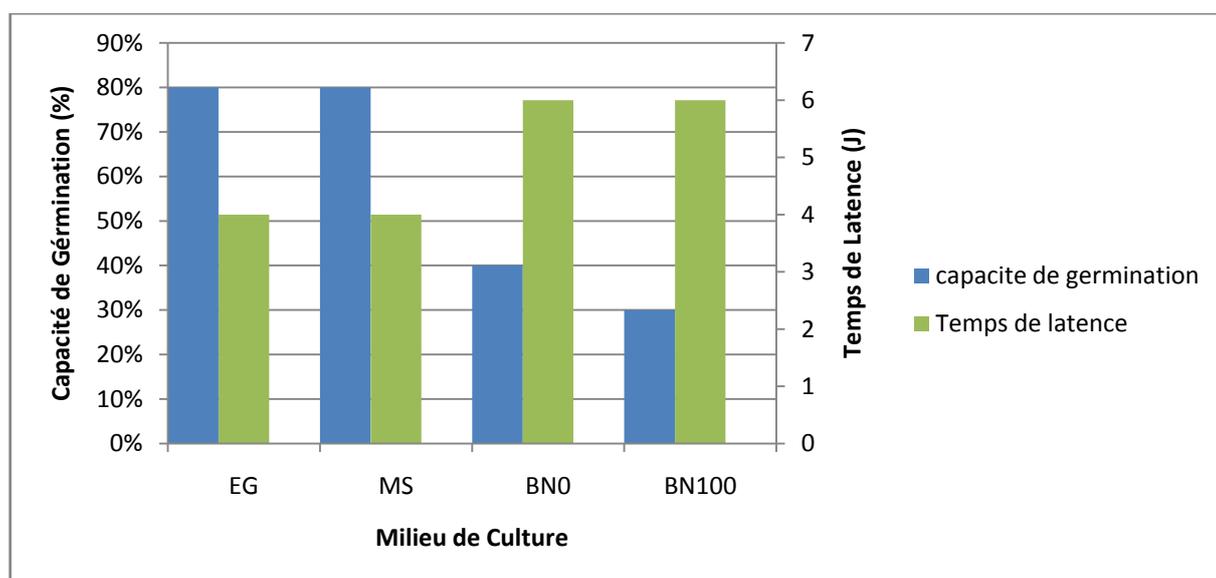


Figure 22 - Influence de différents milieux de base sur la germination des graines *citrus reticulata*

Le temps de latence le plus court est obtenu avec les milieux de l'eau gélosée et MS (4j) avec une capacité de germination la plus élevée à savoir 80%.

Le milieu BN<sub>0</sub> présente un taux de germination de 40% tandis que le milieu BN<sub>100</sub> présente un taux de 30% pour un temps de latence plus long (6j). Enfin, le milieu MBR n'a aucune germination, tous les graines sont nécrosées (fig. 22).

D'après ces résultats, le milieu donnant le meilleur taux de germination et une croissance plus rapide avec l'apparition de la racine est le milieu MS par rapport au milieu gélose qui est utilisé comme témoin (planche 3). Pour la suite de notre travail, on retient le milieu MS comme milieu de culture adéquat.

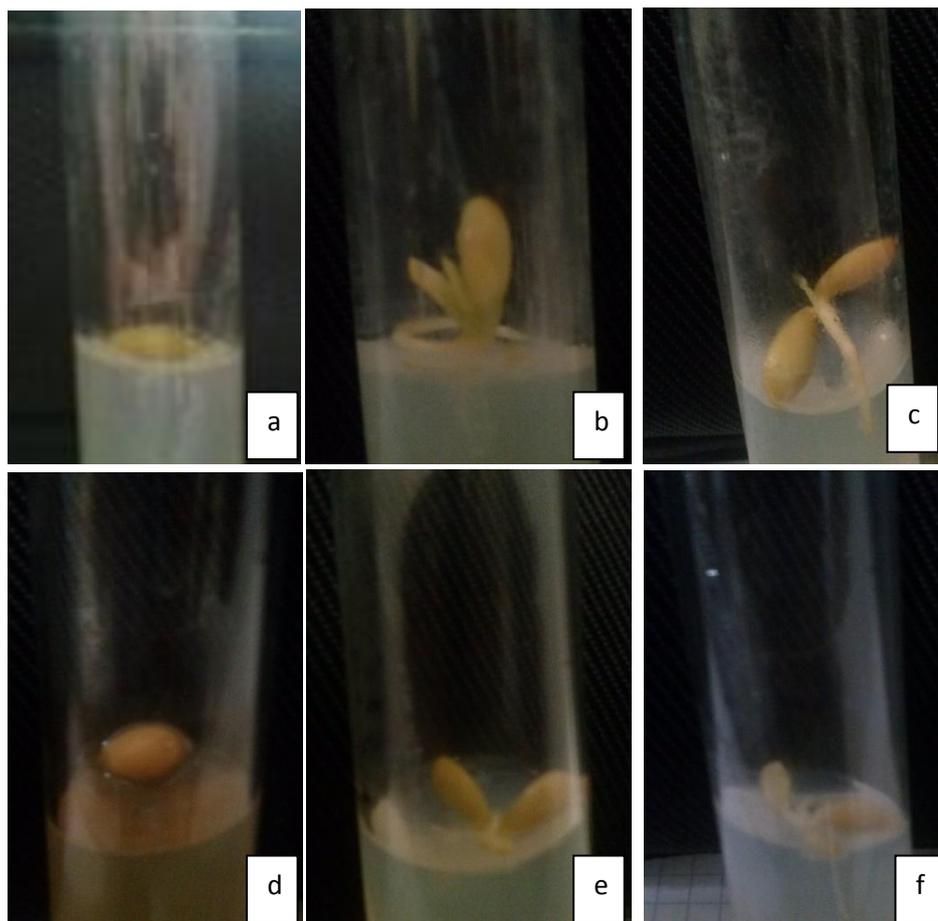


Planche 3 – la culture des graines sur différents milieux de base.

- a- L'état initial de la graine
- b- Une semaine de culture sur le milieu gélose
- c- Une semaine de culture sur le milieu MS
- d- Une semaine de culture sur le milieu MBR
- e- Une semaine de culture sur le milieu BN<sub>100</sub>
- f- Une semaine de culture sur le milieu BN<sub>0</sub>

### 3. Action des hormones de croissance sur la culture des explants de *Citrus lemon*

#### 3.1. Induction de la callogénèse

##### 3.1.1. Intensité de la callogénèse suivant la combinaison hormonale

Nous étudierons l'intensité de la callogenèse d'explants de la tige ; racine et la partie caulinaire de *citrus lemon* cultivent sur milieu MS additionné de la combinaison hormonale. L'importance du cal produit et son aspect varient suivant le milieu de culture employé et les résultats ont été enregistrés avec une moyenne de 50 explants pour chaque type de milieu.

##### 3.1.1.1. Intensité de la callogénèse suivant la combinaison d'ANA et de BAP

L'intensité de la callogénèse a été étudiée pour différents types d'explants tel que la tige ; racine et la partie caulinaires de *citrus lemon*. En effet ce sont les explants de tige qui ont présenté les meilleures potentialités callogénèses. L'importance du cal produit et son aspect varient suivant le milieu de culture employé (planche 4).

A partir des résultats récapitulés sur le tableau 09, le milieu MS supplémenté d'ANA (0,5 mg/L) et de BAP (1mg/L) donne lieu à la callogénèse la plus importante. Par contre la callogénèse la moins importante est enregistrée sur le milieu M3 et pas de réponse callogène au niveau des milieux M2 et M4.

Tableau 09 - Importance et aspect du cal en fonction de la concentration de ANA et BAP.

Milieu	Cytokinine	Auxine	Importance du cal	Aspect du cal
M1	BAP (1mg/L)	ANA (0,5mg/L)	+++	Blanc et friable
M2	BAP (0,1 mg/L)	ANA (1mg/L)	+/-	Blanc et consistant
M3	BAP (0,1 mg/L)	ANA (0,1mg/L)	++	Blanc et friable
M4	BAP (1 mg/L)	ANA (1mg/L)	-	Pas de cal

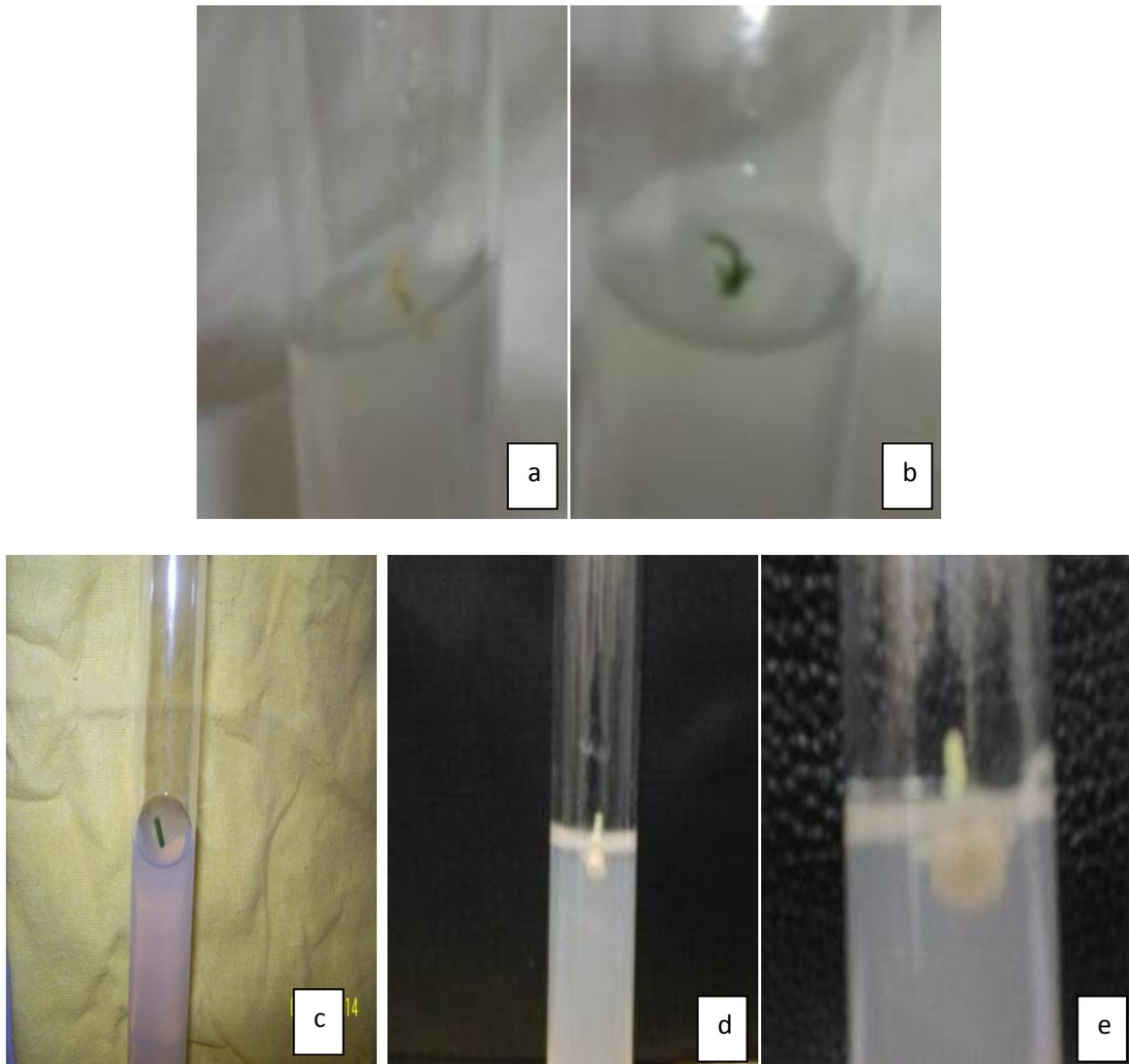


Planche 4 – Induction de la Callogenèse de *citrus lemon* sur milieu MS + ANA (0,5mg/L) et BAP (1mg/L)

- a- Etat initial d'explant de racine
- b- Etat initial d'explant de partie caulinare
- c- Etat initial d'explant de tige
- d- Après 2 semaines de culture : apparition de cal
- e- Après 5 semaines de culture : cal volumineux.

### 3.1.1.2. Intensité de la callogénèse suivant la combinaison 2,4-D et de BAP

A partir de la combinaison hormonale 2,4-D/BAP sur milieu MS, l'intensité de la callogénèse a été étudiée pour différents types d'explants tel que la tige ; racine et la partie caulinaire de *citrus lemon*. En effet ce sont les explants de tige qui ont présenté les meilleures potentialités callogénèses. L'importance du cal produit et son aspect varient suivant le milieu de culture employé (planche 5).

Le milieu M4 de 2,4-D (0,1mg/L) et BAP (1mg/L) donne lieu à la callogénèse la plus importante par contre la callogénèse la moins importante est enregistrée sur le milieu M2 et pas de réponse callogène au niveau des milieux M1 et M3 (Tab. 10).

Tableau 10 - Importance et aspect du cal en fonction de la concentration de 2,4-D et BAP.

Milieu	Cytokinine	Auxine	Importance du cal	Aspect du cal
M1	BAP (0,1mg/L)	2,4D (1mg/L)	-	Pas de cal
M2	BAP (0,1 mg/L)	2,4-D (0,1mg/L)	+	Blanc et consistant
M3	BAP (1 mg/L)	2,4-D (0,5mg/L)	-	Pas de cal
M4	BAP (1 mg/L)	2,4-D (0,1mg/L)	+++	Blanc et friable

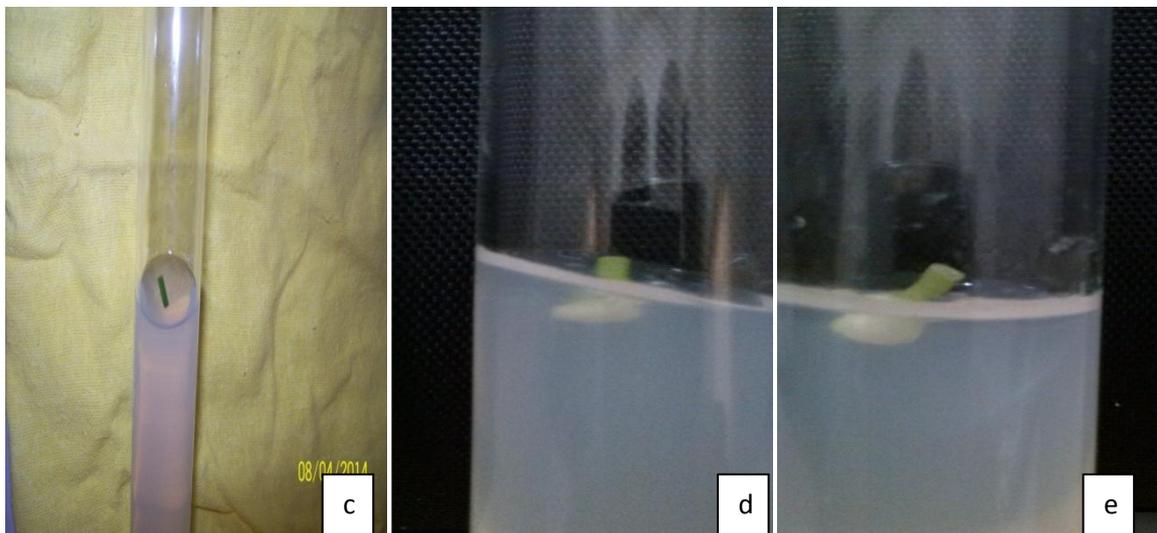
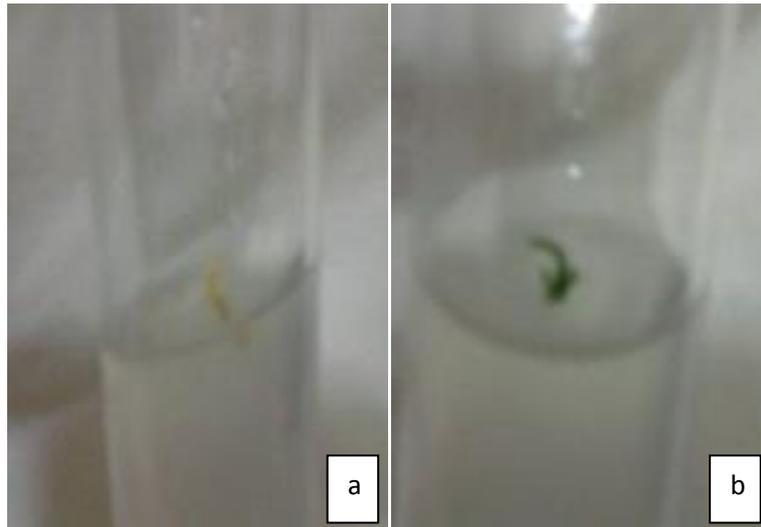


Planche 5 – induction de la Callogenèse de *citrus lemon* sur milieu MS + 2,4-D (0,1mg/L) et BAP (1mg/L)

- a- Etat initial d'explant de racine.
- b- Etat initial d'explant d'apex caulinaire.
- c- Etat initial d'explant de tige
- d- Après 2 semaines de culture : apparition de cal
- e- Après 5 semaines de culture : cal volumineux.

### 3.1.1.3. Intensité de la callogénèse suivant combinaison AIB et de BAP ou de KIN

A partir de la combinaison hormonale AIB/BAP et AIB/KIN sur milieu MS, l'intensité de la callogénèse a été étudiée pour différents types d'explants tel que la tige ; racine et la partie caulinaires de *citrus lemon*. En effet ce sont les explants de tige qui ont présenté les meilleures potentialités callogénèses. L'importance du cal produit et son aspect varient suivant le milieu de culture employé (planche 6).

Le milieu M1 de AIB (0,1mg/L) et BAP (1mg/L) donne lieu à la callogénèse la plus importante par contre la callogénèse la moins importante est enregistrée sur le milieu M3 et pas de réponse callogène au niveau de milieu M2 et M4 (Tab. 11).

Tableau 11 - Importance et aspect du cal en fonction de la concentration de AIB, BAP et KIN.

Milieu	Cytokinine	Auxine	Importance du cal	Aspect du cal
M1	BAP (1mg/L)	AIB (0,1mg/L)	+++	Cal vert consistant
M2	BAP (1 mg/L)	AIB (1mg/L)	-	Pas de cal
M3	KIN (1 mg/L)	AIB (0,1mg/L)	++	Cal vert consistant
M4	KIN (1 mg/L)	AIB (1mg/L)	-	Pas de cal

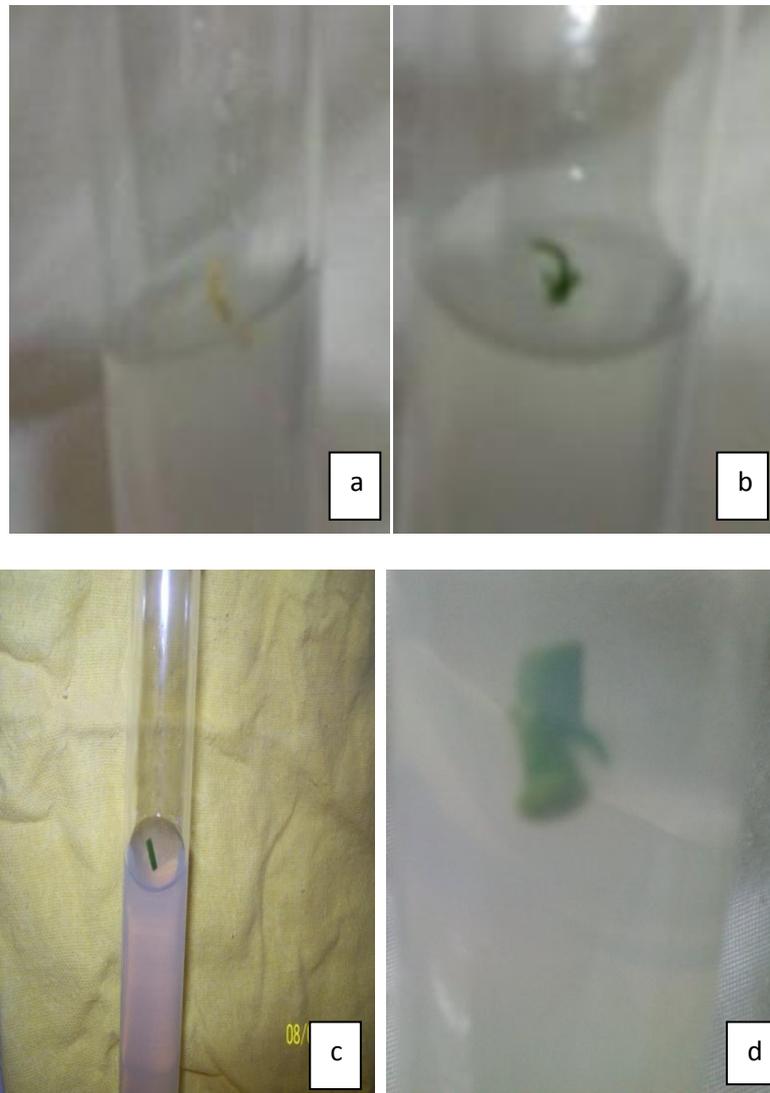


Planche 6 – Induction de la Callogenèse de *citrus lemon* sur milieu MS + AIB (0,1mg/L) et BAP (1mg/L)

- a- Etat initial d'explant de racine
- b- Etat initial d'explant d'apex caulinaire
- c- Etat initial d'explant de tige
- d- Après 5 semaines de culture de cal de la tige.

Les trois milieux utilisés sont callogènes. Nous observons sur les milieux MS + ANA (0,5mg/L), BAP (1mg/L) ; MS + 2,4-D (0,1mg/L) et BAP (1 mg/L), les cals produits sont blanches ; friables et de volume important. Par contre sur Le milieu MS +AIB (0,1mg/L) et BAP (1mg/L), les cals produits est verts, consistant et de volume moins important (planche 7).

En effet, de nombreux auteurs en l'occurrence Ducreux et Rossignol, (1986) estiment qu'un cal friable a une croissance rapide comparativement aux cals durs dont la croissance est plus lente. Les cals jaunâtres et bruns ainsi que les cals pâteux ou très durs ne deviennent jamais embryogènes, seule les cals fragiles et de couleurs blanchâtre ou beige le deviennent.

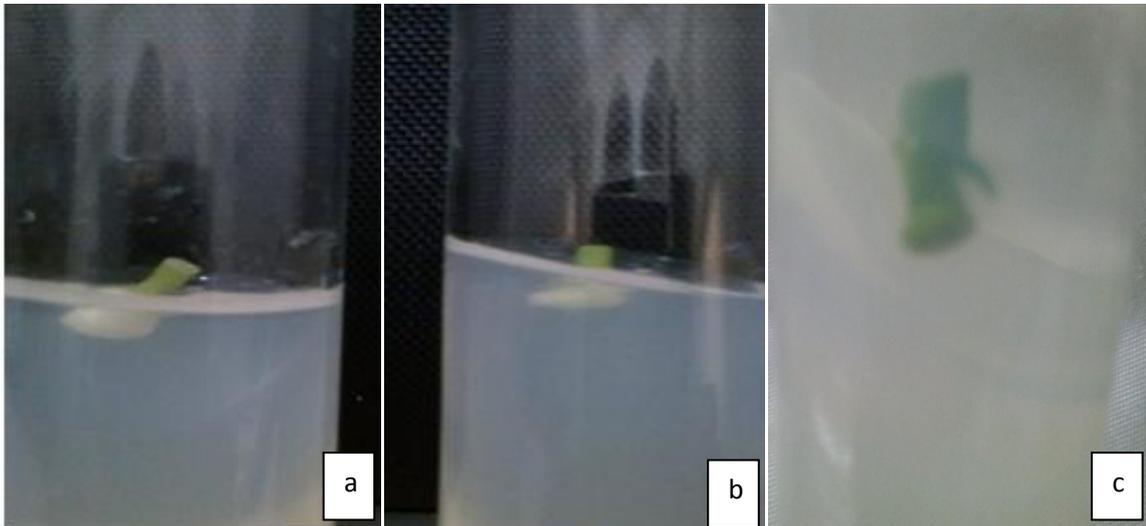


Planche 7 - Différence de l'intensité de cal de *citrus lemon* entre milieu MS + ANA (0,5mg/L), BAP (1mg/L) et milieu MS + 2,4-D (0,1mg/L) et BAP (1 mg/L) et MS +AIB (0,1mg/L) et BAP (1mg/L).

- a- cal sur milieu MS + ANA/BAP
- b- cal sur milieu MS + 2,4-D/BAP
- c- cal sur milieu MS+AIB/BAP

### 3.1.2. Fréquence de la callogenèse de citrus lemon suivant la combinaison d'auxine et de cytokinine

La fréquence de la réponse callogène est exprimée, pour l'espèce étudiée *citrus lemon*, par le pourcentage d'explants donnant lieu à une prolifération cellulaire, en fonction du milieu utilisé. Les résultats ont été enregistrés avec une moyenne de 50 explants pour chaque type de milieu.

#### 3.1.2.1. Fréquence de la callogenèse suivant la combinaison d'ANA et BAP

Les résultats de l'étude de la fréquence de la callogenèse suivant la combinaison d'ANA et de BAP sont indiqués sur la figure 23.

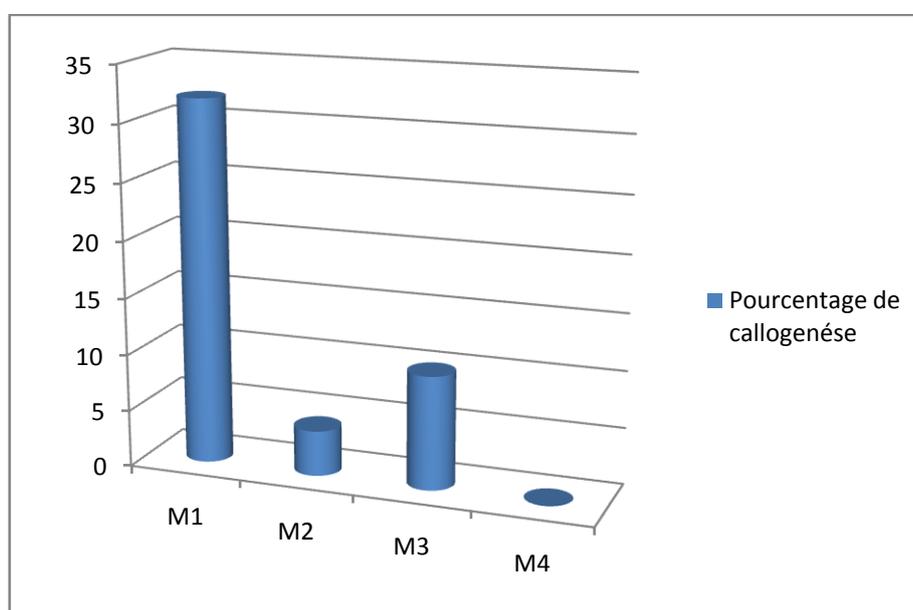


Figure 23 - Fréquence de la callogenèse suivant la combinaison d'ANA et BAP

Le milieu MS d'ANA 0,5 mg/L et BAP 1 mg/L est celui qui provoque la meilleure réponse callogène pour les explants de tige avec une fréquence 32% par rapport au milieu MS d'ANA 0,1 mg/L et BAP 0,1 mg/L qui présente une fréquence de 10% des fragments répondent positivement ; le milieu MS d'ANA 1 mg/L et BAP 0,1 mg/L répond avec une fréquence 4% et ne semble pas très favorable à la callogenèse (fig.23). Enfin, on n'a pas observé une réponse callogène au niveau le milieu MS d'ANA 1 mg/L et BAP 1 mg/L.

#### 3.1.2.2. Fréquence de la callogenèse suivant la combinaison de 2,4-D et BAP

Le milieu MS de 2,4-D 0,1mg/L et BAP 1mg/L s'avère être le plus favorable par rapport aux autres milieux mais avec une fréquence de 15%. Sur le milieu MS

de 2,4-D 0,1 mg/L et BAP 0,1 mg/L, la callogénèse est très faible, elle présente une fréquence de 4% seulement des explants de *citrus lemon* qui sont le siège d'une faible prolifération cellulaire. La figure 24 rend compte de la fréquence de la réponse callogène.

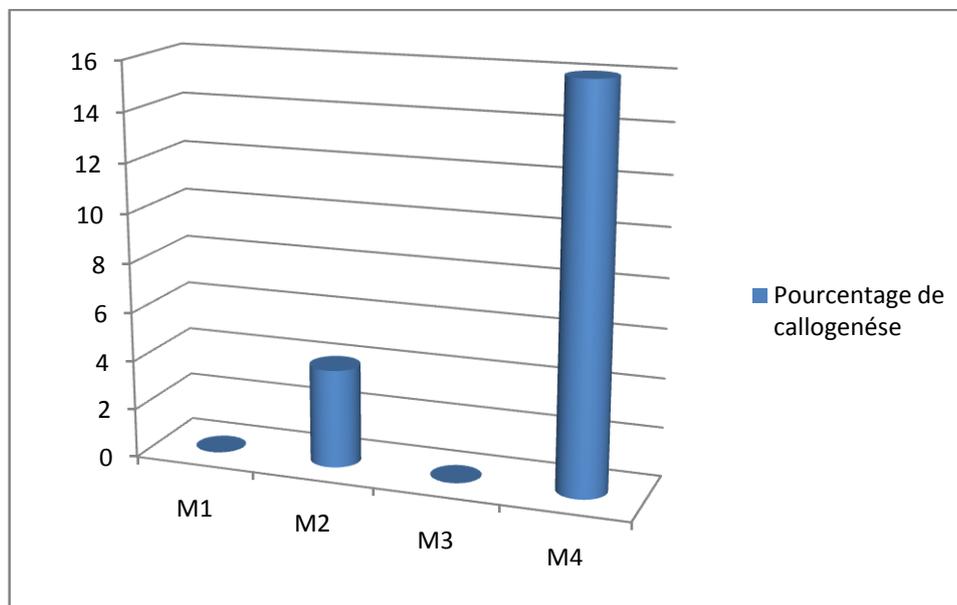


Figure 24 - Fréquence de la callogénèse de *citrus lemon* suivant la combinaison d'2,4-D et BAP

### 3.1.2.3. Fréquence de la callogénèse de *citrus lemon* suivant la combinaison d'auxine AIB et de cytokinines BAP et KIN

Le milieu M1 de AIB 0,1 mg/L et BAP 1 mg/L d'une fréquence de 24% s'avère être le plus favorable par rapport aux autres milieux. Sur le milieu M3 de AIB 0,1 mg/L et KIN 1 mg/L, la callogénèse observée est faible, elle présente une fréquence de 10% seulement des explants par contre pas de réponse callogène pour les milieux M4 et M2. La figure 25 rend compte de la fréquence de la réponse callogène.

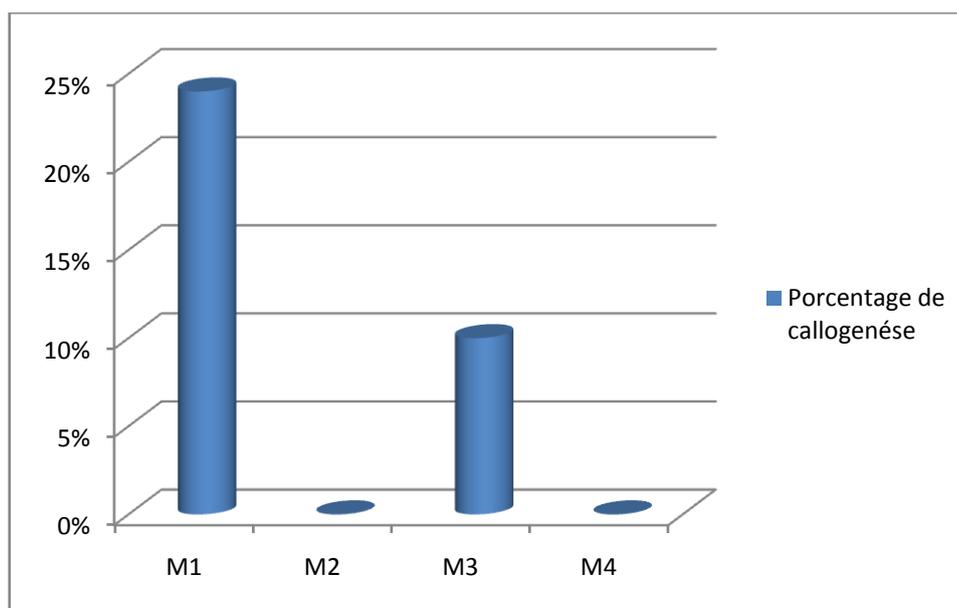


Figure 25 - Fréquence de la callogenèse de *citrus lemon* suivant la combinaison d'AIB, BAP et KIN

Au cours de ces études sur la callogenèse de *citrus lemon*, l'observation a été réalisée sur des cals provenant de milieux ayant donné les meilleurs pourcentages d'induction callogénèse. Ainsi, l'aspect des cals change en fonction du milieu de culture et des conditions d'incubation. En effet, l'incubation, dans le milieu de ANA 0,5mg/L BAP 1mg/L a donnée la meilleure réponse callogène. L'initiation de la callogenèse à partir du 5<sup>ème</sup> jour de culture et à l'obscurité, donne des cals ayant une coloration jaune et intensité importante. Par contre cette intensité est moins importante et tardive sur le milieu MS d'2,4-D (0,1mg/L) et BAP (1mg/L) où on a remarqué l'initiation de cal après le 20<sup>ème</sup> jour de la culture.

La combinaison de AIB avec BAP et KIN a donnée AIB 0,1mg/L BAP 1mg/L l'intensité la plus importants, cultivés en à la lumière, les cals prennent une coloration verte foncé et initie la callogenèse à partir 8<sup>ème</sup> jours de culture.

Il faut cependant souligner que la réponse des explants mis en culture varie en fonction de la variété, la nature et la concentration de l'hormone de croissance additionnée. Le suivi de la cinétique de croissance des cals nous a permis de mettre en évidence que le milieu MS ANA 0,5 mg/L BAP 1 mg/L représente 32% d'explants réponde a la callogenèse, il a grand effet sur l'induction callogéné par rapport au MS AIB 0,1 mg/L BAP 1 mg/L qui a était plus au moins important avec 24% d'explants réponde à la callogenèse, le milieu MS 2,4D 0,1 mg/L BAP 1mg/L était le plus faible avec 15% d'explants réponde a la callogenèse.

Plusieurs travaux montrent que l'utilisation d'auxines et en particulier ANA assure le déclenchement de cals chez un grand nombre d'espèces de *Citrus*. D'après les

expériences de Neelam (2011), la meilleur callogenèse a été dans le milieu MS avec ANA 0,5mg/L et BAP 2mg/L.

Benyahia et al. (2012) ont rapporté que, en termes de taille des cals, le milieu MS avec 2,4-D 1mg/L et BAP 0,5mg/L a permis l'obtention des cals granuleux et volumineux par rapport aux autres milieux utilisés tel que ANA 0,5mg/L et BAP 1mg/L.

Ramdan et al. (2014) ont utilisé différentes concentrations de régulateurs de croissance 2,4-D et BAP (0,5 ; 1 ; 2 et 3 mg/L) dans le but d'obtenir la meilleure formation de cals. Ils affirment que la combinaison qui a un effet significatif sur l'induction de cal a été observée avec 2,4-D 1 mg/L et BAP 0,5 mg/L.

### 3.2. Induction de la Caulogénèse indirecte de citrus lemon

Les cals provient de la callogenèse, on a utilisés pour obtenu la caulogénèse indirecte. Ceci pourrait être attribué en présence des rapports auxine/ cytokinine dans le milieu de culture. Nous avons pensé à découpé les cals de *citrus lemon* en petits morceaux (planche 8) puis les repiques sur d'autres milieux MS contenant des combinaisons hormonales. Il serait possible de stimuler la régénération des bourgeons, voir augmenter les manifestations caulogènes attendues. L'étude a été faite sur les milieux MS additionné d'ANA et 2,4-D combiné avec BAP ou KIN.

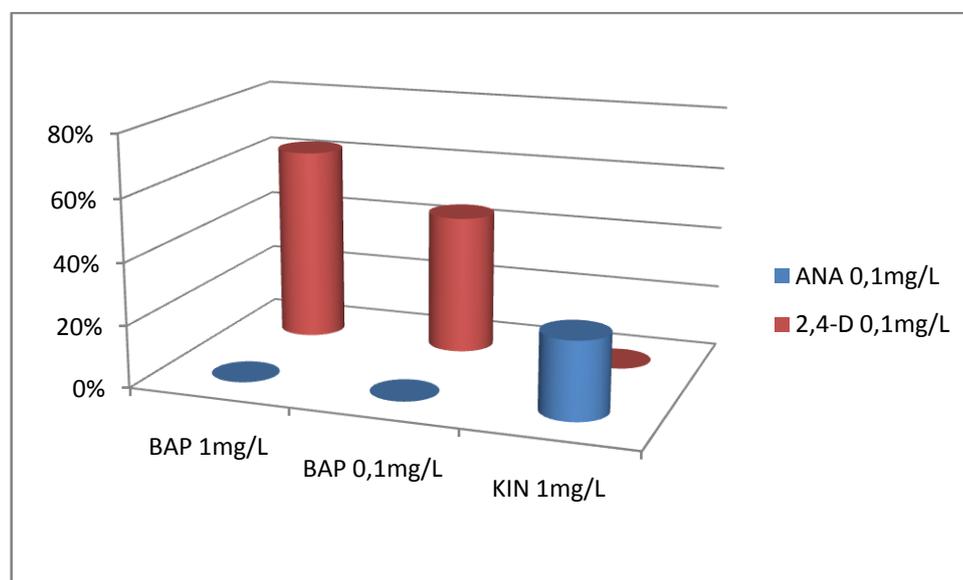


Figure 26 - Pourcentage d'explants callogénés de *citrus lemon* en fonction des différentes combinaisons hormonales sur le milieu MS

Après 20 jours en moyenne de culture on constate que aucune formation de bourgeon na été développe au niveau des cals, par contre on a remarque la croissance du volume des cals. Il est plus élevé sur le milieu MS 2,4-D 0,1 mg/L BAP 1 mg/L avec 63% alors que elle est de 45 sur le milieu MS 2,4-D 0,1 mg/L BAP

0,1mg/L. Une réponse callogène avec KIN 1mg/L avec un faible pourcentage de 25% mais pas de croissance sur le milieu MS ANA 0,1 mg/L avec BAP 1 mg/L et BAP 0,1 mg/L (fig. 26).

Au cours de nos études sur la caullogenèse indirecte de *citrus lemon*, nous avons vu que les explants de *citrus lemon* cultivés n'ont pas tous le même comportement et que ce dernier a varié suivant la composition du milieu de culture utilisé. La formation de bourgeons à toujours été directe, elle ne s'est jamais produite à partir d'un cal.

Les expériences de Ibrahim (2012), ont rapporté que La régénération indirecte de pamplemousse (*citrus maxima*) a été obtenu sur le milieu MS additionné de 0,1mg/L ANA avec BAP 1mg/L un taux de 80%.des résultats similaire ont été obtenu avec Taha (2009) ; Begum et al (2003).

Ali et Mirza(2006), ils ont utilise des milieux MS additionné de 2,4-D et ANA pour la régénération indirecte des explants de citron (*citrus limon*).ils sont constate que le taux de régénération le plus élève été sur de milieu additionné 2,4-D avec 92% et sur milieu additionné ANA est de 70%.

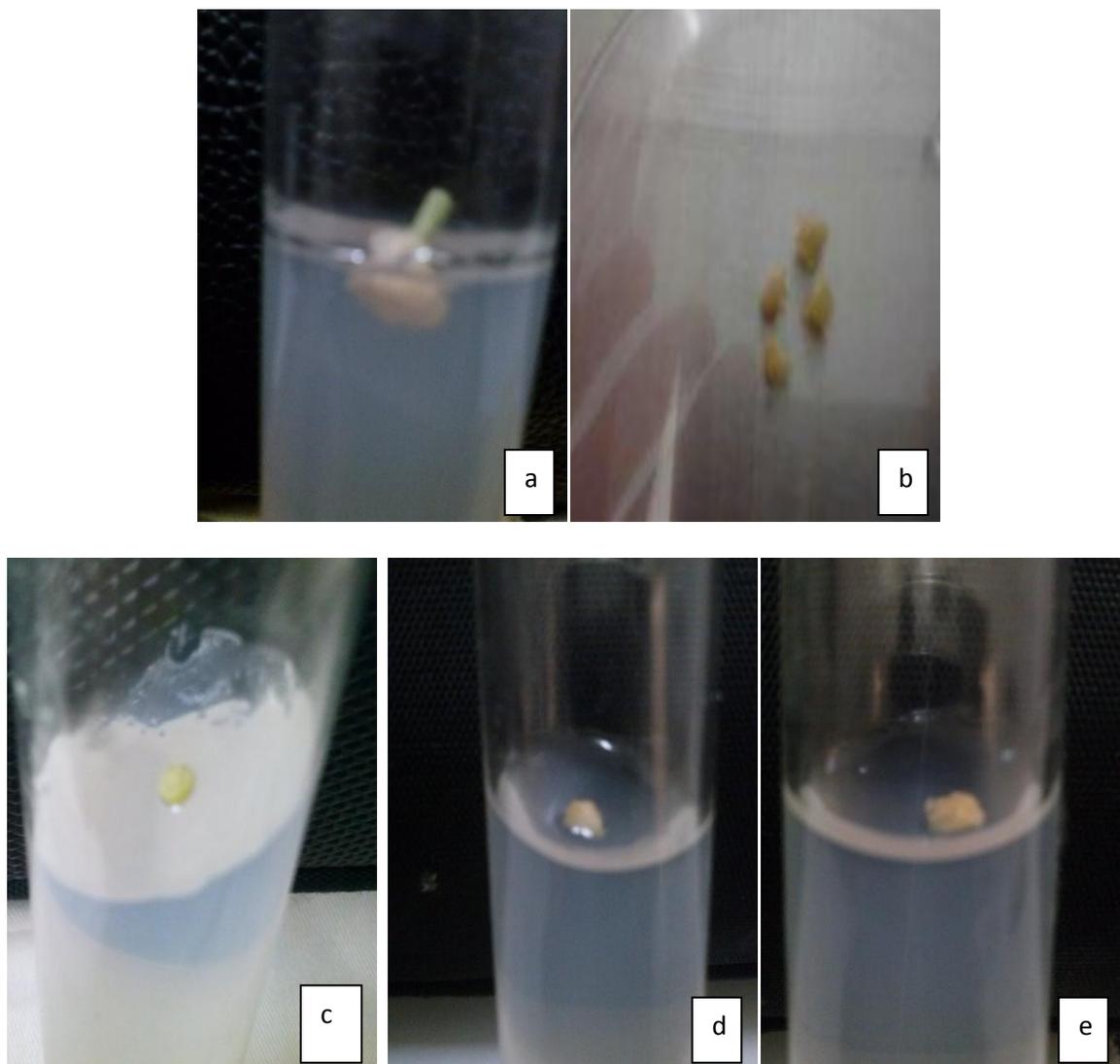


Planche 8 - Callogenèse de *citrus lemon* sur le milieu MS+ANA/BAP et 2,4-D/BAP

- a. état initial du cal
- b. état du cal divisé
- c. cal sur le milieu ANA/KIN
- d. cal sur le milieu ANA/BAP
- e. cal sur le milieu 2,4-D/BAP.

### 3.3. Induction de la Caulogénèse directe de citrus lemon

Certains milieux employés lors de la callogenèse se sont révélés caulogènes après la mise en culture des explants de *citrus lemon*. L'analyse de la fig. 27, fait ressortir que la combinaison de différentes concentrations de BAP (0,1 ; 0,5 ; 1 mg/L) avec les auxines, la BAP 1 mg/L avec AIB et ANA ont permis d'obtenir le pourcentage d'explants caulogènes le plus élevé respectivement 56% et 42%, tandis que 2,4-D il été 20%.

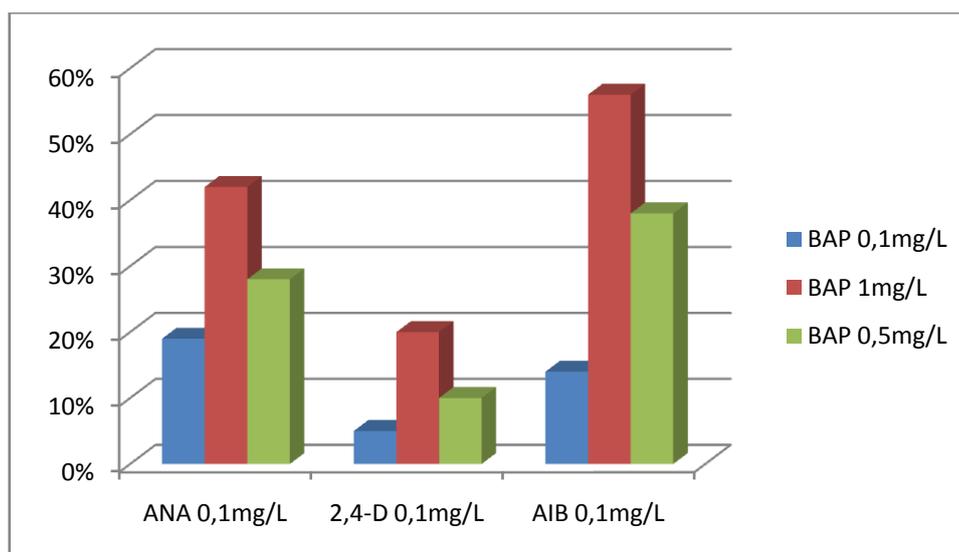


Figure 27- pourcentage d'explants caulogénés de *citrus lemon* en fonction des différentes combinaisons hormonales sur le milieu MS

La mise en culture d'explant d'apex caulinaire de *citrus lemon* sur le milieu MS AIB 0,1 mg/L et BAP 1 mg/L se révèle le plus caulogène, puisque 56% des explants cultivés sont le siège d'une néoformation de bourgeons (Tab.12). En outre, nous notons en moyenne 4 pousses feuillées par explants (planche 8).

Le milieu MS ANA 0,1 mg/L BAP 1 mg/L donne lieu, lui aussi, à des résultats intéressants ; 42% des fragments mis en culture produisent 4 bourgeons en moyenne par explant (planche 9). Les résultats enregistrés avec le milieu MS 2,4-D 0,1 mg/L et BAP 1 mg/L sont faibles par rapport aux autres milieux ; présente un taux de 20% (Tab.12) et nombre de bourgeons 2 en moyenne par explant.

Tableau 12 - Fréquence et intensité de la caulogénèse directe de *citrus lemon* suivant la nature du milieu de culture.

Milieu de culture	Explants caulogènes (%)	Nombre moyen de bourgeons/explants
MS 2,4-D 0,1 mg/L BAP 1mg/L	20%	2
MS ANA 0,1 mg/L BAP 1 mg/L	42%	4
MS AIB 0,1 mg/L BAP 1 mg/L	56%	4

Ce présent travail nous a permis d'obtenir une organogénèse, avec formation de pousses feuillées directement sur les explants (organogénèse directe).

Nous avons constaté que, l'usage de la BAP avec différentes auxines dans le milieu d'induction est favorable à la caulogénèse directe sur l'ensemble des explants. Plus la concentration de BAP utilisée augmente, plus le pourcentage des explants caulogènes augmente.

Les résultats similaires aux nôtres, signalent l'induction d'organogénèse directe est favorisée par l'addition de cytokinine dans le milieu. Les meilleures réponses ont été enregistrées avec le milieu additionné ANA (0,5 ; 1 mg/L) et AIB (0,5 ; 1 mg/L) pour l'organogénèse (Singh et al, 1994 ; Kiran et Bikramjit, 2012).

L'induction de pousses a été constatée directement proportionnelle à l'augmentation des niveaux de BAP et ANA sur le milieu de MS. Usman et al. (2005) ont montré le pourcentage le plus élevé (95,13%) a été lors la culture avec concentration de BAP (10 mg/L) tandis que la capacité de régénération des pousses a été plus bas (47,50%) avec la concentration BAP (0,1 mg/L).

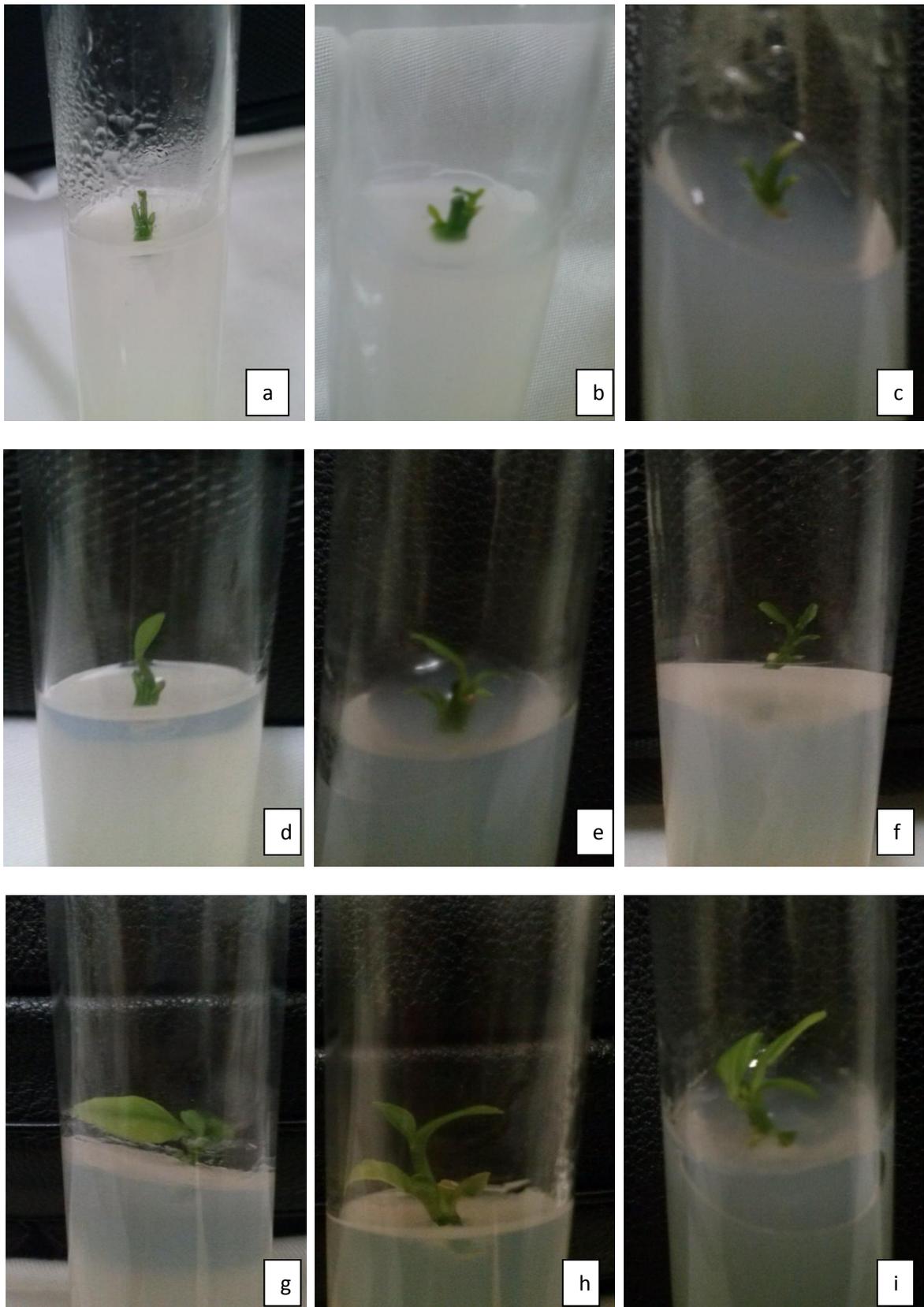


Planche 9 – la caulogénèse directe de *citrus lemon* sur le milieu MS AIB 0,1 mg/L + BAP 1 mg/L ; MS ANA 0,1 mg/L + BAP 1 mg/L ; MS 2,4-D 0,1 mg/L + BAP 1mg/L.

- a. Apparition de bourgeons après une semaine de culture sur le milieu MS 2,4-D 0,1 mg/L + BAP 1mg/L
- b. Apparition de bourgeons après une semaine de culture sur le milieu MS AIB 0,1 mg/L + BAP 1 mg/L
- c. Apparition de bourgeons après une semaine de culture sur le milieu MS ANA 0,1 mg/L + BAP 1 mg/L et
- d. Développement de feuilles après 2 semaines de culture sur le milieu MS 2,4-D 0,1 mg/L + BAP 1mg/L ;
- e. Développement de feuilles après 2 semaines de culture sur le milieu MS AIB 0,1 mg/L + BAP 1 mg/L;
- f. Développement de feuilles après 2 semaines de culture sur le milieu MS ANA 0,1 mg/L + BAP 1 mg/L.
- g. Apparition des feuilles secondaires après 5 semaines de culture sur le milieu MS 2,4-D 0,1 mg/L + BAP 1mg/L ;
- h. Apparition des feuilles secondaires après 5 semaines de culture sur le milieu MS AIB 0,1 mg/L + BAP 1 mg/L;
- i. Apparition des feuilles secondaires après 5 semaines de culture sur le milieu MS ANA 0,1 mg/L + BAP 1 mg/L.

# *Conclusion générale*

## Conclusion générale

Les techniques employées en biotechnologie végétale constituent actuellement d'importantes voies pour la multiplication et l'amélioration génétique des espèces végétales, dont les arbres fruitiers en général et les agrumes en particulier.

Contrairement à la multiplication traditionnelle, les nouvelles techniques, dont la culture *in-vitro*, sont un moyen efficace pour coloniser rapidement un milieu favorable. Elles permettent d'obtenir plusieurs descendants à partir d'un seul et même individu. Ces descendants sont non seulement parfaitement identiques entre eux, mais aussi identiques à la plante mère. La multiplication végétative assure la stabilité des caractères dans la descendance, elle augmente la production de végétaux choisis pour leurs qualités et elle permet également de sauver certaines espèces. En effet, grâce à la culture *in-vitro*, la nouvelle plante obtenue est saine, même si le pied mère était malade.

La multiplication *in-vitro* par micropropagation est une alternative de propagation conforme et rapide pour la multiplication des *Citrus*. Au terme de cette étude, nous pouvons conclure que cette espèce récalcitrante peut être cultivée *in-vitro*.

Notre étude consiste à améliorer les techniques de propagation en se référant à la multiplication *in-vitro* et d'essayer de régénérer *in-vitro* des plants entiers de *Citrus* via l'organogenèse directe et indirecte.

L'ensemble des résultats expérimentaux concernant les conditions de multiplication de *Citrus*, réalisés dans ce travail, permettent de tirer les conclusions suivantes concernant l'optimisation des conditions de culture *in-vitro* par micropropagation :

- La désinfection de notre matériel végétal par l'hypochlorite de sodium à une concentration de 10% semble être le plus favorable ;
- Le temps de stérilisation présente un effet significatif sur la germination et la contamination, la stérilisation pendant un temps de 10min, est la plus performante ;

Nous avons testé trois principaux facteurs susceptibles d'influencer la germination pendant l'incubation qui sont :

- Le tégument des graines n'a pas d'effets sur la germination mais il accélère la croissance des plantules;
- La température la plus convenable pour la germination est 25°C ;
- La germination à l'obscurité est avantagée mais pour une période allant de 2 à 3 semaines pas plus ;

- Le milieu MS est plus favorable pour la germination des graines par rapport autres milieux de culture ;
- Concernant la callogenèse, on constate que la composition hormonale influence considérablement la taille et la texture de cals produites. Le milieu MS, additionné par des hormones de l'ANA à 0,5mg/L et BAP à 1mg/L, s'est révélé plus favorable pour la callogenèse ;
- L'importance de la callogenèse ne dépend pas seulement de la nature du régulateur de croissance mais aussi de sa concentration. Il faut une dose minimale pour pouvoir obtenir une induction callogène ;
- le suivi de la cinétique de croissance des cals nous a permis de mettre en évidence que la callogenèse est profondément influencée par le milieu MS additionné 2,4-D à 0,1mg/L, mais il n'est pas d'effets sur la caulogenèse indirecte ;
- Concernant la caulogenèse, les résultats de notre étude nous ont amené à confirmer l'usage de la BAP avec différents auxines dans le milieu d'induction est favorable à la caulogenèse directe sur l'ensemble des explants. Plus la concentration de BAP utilisée augmente, plus le pourcentage des explants caulogènes augmente ;
- Le meilleur développement des bourgeons en pousses est obtenu en présence de l'AIB à 0,1mg/L et BAP à 1mg/L et favorise la caulogenèse directe.

En perspectives, la poursuite de ces travaux est envisagée afin d'aboutir à l'amélioration du rendement de la technique de micropropagation et de prendre en considération les facteurs influençant la culture *in-vitro*. Cependant, Il est nécessaire de maîtriser l'enracinement des embryons et l'acclimatation.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

**Akita M. et Takayama S.** - 1994 - Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant cell, tissue and organ culture* 36 (2) : 177-182.

**Ali S. et Mirza B.** - 2006 - Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) : Effect of explants type and hormone concentration. *Acta Botanica Croatica* 65 (2) : 137-146.

**Al-Taha H.A.** – 2009 - The use of plant tissue culture technique in micropropagation of salt tolerant plants of local orange trees (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. cv. Local Orange). These de doctorat, Faculté d'Agriculture, Université de Bassora, Iraq : 192

**Al-Taha H.A.K., Jasim A.M. et ABBAS M.F.** – 2012 - Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from nucleus tissues of Local orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Acta agriculturae Slovenica* : 185-189

**Anonyme** - 2004 - Information de marché dans le secteur des produits de base : Agrumes. CNUCED - Info Comm.

**Anonyme** - 2006 - Distribution map of quarantine pests for Europe. *Phaeoramularia angolensis*. Préparé par le CABI et l'OEPP pour l'UE sous contrat 90/399003

**Anonyme** - 2007 - Article de vulgarisation 2007. Nouvelle édition de l'Encyclopédie Universelle. [www.isv.cnrs-gif.fr/recherche/cr/Auxine](http://www.isv.cnrs-gif.fr/recherche/cr/Auxine).

**Anonyme** - 2010 - La micropropagation 2010 : [www.cannaweb.org/fcf/](http://www.cannaweb.org/fcf/)

**Anonyme** - 2013 - Campagne 2012/2013 : nette hausse de la production oléicole et agrumicole. [www.algerie360.com](http://www.algerie360.com)

**Anonyme - 2013** - La production les agrumes. [www.vitamedz.com](http://www.vitamedz.com)

**Arditti J.** - 2008 - Micropropagation of Orchides : Volume I. Wiley -Blackwell Publishing Edition.

**Atkinson N.J., Newbury H.J et Ford-Lloyd B.V** - 1991 - In-vitro adventitious root induction in *Antirrhinum majus* L. *Plant cell, tissue and organ culture* 27 : 77-79.

**Auge R.** - 1989 - La culture in-vitro et ses applications horticoles. Editeur : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.

**Azim F., Rahman M.M, Prodhon S.H., Sikdar S.U., Zobayer N. et Ashrafuzzaman M.** – 2011 - Development of efficient callus initiation of Malta (*Citrus sinensis*) Through tissue culture. *International journal of agricultural research, innovation and technology* 1 (1-2) : 64-68.

**Bachès B. et Bachès M.** - 2002 - Agrumes : Comment les choisir et les cultiver facilement. Editeur : Ulmer, Paris, France : 96.

**Bakry F., Didier C., Ganry J., le Bellec F., Lescot T., Pinon A., Rey J.Y., Teisson C. et Vannié H.** - 2009 - Les espèces fruitières. In : Memento de l'agronome. Editeur : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Paris, France : 929-1022.

**Banfalvi Z., Molnar A., Kostyal Z., Lakatos L. et Molnar G.** - 1997 - Comparative studies on potato tuber development using an in-vitro tuber induction system. *Acta Biologica Hungarica* 48 (1) : 77-86.

**Bardeau F.** - 2009 - Les huiles essentielles : Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Editeur : Fernand Lanore, Paris, France.

- Barrett H.C. et Rhodes A.M.** - 1976 - A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. *Systematic Botany* 1 : 105-136.
- Bechir J.** - 1955 - Les maladies de dépérissement des agrumes. *Revue de Mycologie. Supplément Colonial* 20 (1) : 1-47.
- Begum F., Amin M.N., Islam S., Azad M.A.K. et Rehman M.M.** – 2003 - In vitro plant regeneration from cotyledon-derived callus of three varieties pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osb.). *Journal of Biological Sciences* 3 (8) : 751–759
- Belguendouz A.** - 2012 - Essai de substitution des milieux de culture en micropropagation et la physiologie de la microtubérisation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Mémoire de magister, Université de Tlemcen-Algerie.
- Benyahia H., Chetto O., Dominique D. et Yann F.** - 2012 - Mise au point des conditions de calogénèse, caulogénèse et rhizogénèse chez les porte-greffes d'agrumes à partir d'épicotyle : cas du citrange Troyer. *Journal of Applied Biosciences* 60 : 4375– 4387
- Bhojwani S.S. et Razdan M.K.** - 1996 - Plant tissue culture : Theory and practice. Editeur : Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Pays-Bas.
- Biche M.** – 2012 - Les principaux insectes ravageurs des agrumes en Algérie et leurs ennemis naturels. Guide pratique. Editeur : FAO, Algérie.
- Bommineni V.R. et Jauhar P.P.** - 2003 - Regeneration of plantlets through isolated scutellum culture of durum wheat. *Plant Science* 116 (2) : 197-203.
- Bonkena B.** - 2001 - Analyse et perspectives d'intégration des marchés des oranges (*Citrus sinensis*) dans la ville de Kinshasa (Cas des marchés de Matete et de Rond point Ngaba). Mémoire, Faculté des Sciences Agronomiques, Unikin-Congo.
- Boxus P.** - 1989 - Palynologie quantitative du Tertiaire de Bioul (Entre-Sambre-et-Meuse, Belgique). Mémoire de Licence, Université de Liège- Belgique.
- BOXUS P. et BELAIZI M., 1995.** *In-vitro* shoot multiplication of Cork.oak (*Quercus suber* L.) influence of different carbohydrates. *Bull Rech.Agron.Gembloux* 30(1-2).
- Brenes Hines A., García Tapia V. et Velasco Urquizo E.** – 2002 - Citrus. In : In vitro collecting techniques for germplasm conservation. IPGRI Technical Bulletin 7 : 56-60
- Bretonneau J. et Faure Y.** 1992 - Atlas d'arboriculture fruitière. Volume I. Editeur : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.
- Briggs W.R.** - 1964 - Phototropism in higher plants. In *Phytophysiology : General principles. Action of light on plants.* Editeur : Academic Press, Elsevier Ltd : 223-271
- CAMEFORT H., 1977:** Morphologie des végétaux vasculaires .Ed DOIN,418p
- Caraglio Y., Barthélémy D., Bouchon J., Reffye P.** 1997. Modélisation et stimulation de l'architecture des végétaux. *Science Update, Paris, France,* , pp. 11–87.
- Cassells A.C.** - 1987 - In-vitro induction of virus-free potatoes by chemotherapy. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 3 : 40-50.
- Cassells A.C.** - 2003 - Micropropagation. In : *Encyclopedia of Applied Plant Sciences.* Editeur Elsevier Academic Press, Californie -USA : 1353 - 1360
- Cassin J., Bourdeaut J., Fougue A., Furon V., Gaillard J.P., LeBourdelle J., Montagut G. et Moreuil C.** - 1969 - The influence of climate upon the blooming of citrus in tropical areas. *Proceedings first International Citrus Symposium* 1 : 315-323.
- Collet G. et Lê C-L.** - 1988 - Micropropagation de porte-greffe de pommier et de poirier. II. Enracinement in-vitro de *Pyrus malus* L. (M25, 26, 27, MM106, M9 type Jork ) et

- Cydonia oblonga Mill. (A). Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture 20 (2) : 131-138.
- Cornu D. et Boulay M.** - 1986 - La multiplication végétative : Techniques horticoles et culture in vitro. Revue Forestière Française, numéro spécial (38) : 60-68
- DALVESCO L.L et GUERRA P.M., 2001.** The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture 64: 19 – 25
- Davies F.S. et Albrigo L.G.** – 1994 - Environmental constraints on growth, development and physiology of Citrus. In : Citrus. Editeur : CABI Pub, Wallingford, UK : 51-82.
- Demarly Y.** – 1985 - L'épigénique. Bulletin de la Société Botanique de France, Actualités Botaniques 132 (3-4) : 79- 94.
- DODEMAN V.L ., DUCREUX G. et KREIS M.,1997.** Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis . Journal of Experimental Botany 48N 313 : 1493 -1509.
- Dominique B. et Gilbert B.** -2013 multiplication des plantes horticoles .Editeur : Tec & Doc Lavoisier.
- Donnelly D.J., Coleman W.K. et Coleman S.E.** - 2003 - Potato microtuber production and performance : A review. American Journal of Potato Research 80 (2) : 103-115.
- Dougall D.K.** – 1980 - Nutrition and metabolism. In: Plant tissue culture as a source of biochemicals. Editeur : CRC Press, Florida, USA : 21-58
- Dris R.** – 2005 – Crops : Growth, quality and biotechnology. Editeur : WFP pub., Helsinki, Finland.
- Ducreux G., Rossignol L. et Rossignol M.** – 1986 - La pomme de terre. La Recherche 174 : 193-202
- EGERTSDOTTER U et ARNOLD S.V.,1998.** Development of somatic embryos in Norway spruce. Jou EXP Bot 49 (319): 155 – 162
- Engler H.G.A.** – 1931 - Rutaceae. In : Die natürlichen Pflanzenfamilien. Editeur : Engelmann, Leipzig, Allemagne : 187-359.
- Espinoza N., Lizzarraga R., Siguenas C., Buitron F., Brayn J. et Dodds J.H.** – 1992 - Tissue culture : Micropropagation, conservation and export of potato germplasm. Editeur : CIP Research Guide, International Potato Center, Lima, Peru : 19.
- FAOSTAT** – 2013 - Division de la Statistique.
- Fossard R.A.** - 1976 - Tissue culture for plant propagators. Editeur : Department of Botany, University of New England, Armidale - Australie
- FRACARO F et ECHEVERRIGARAY S ., 2001.** Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil . Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 1- 4
- Goell A. et Cohen A.** – 1981 - Combining irrigation regimes with girdling techniques in citrus trees (a new experimental mode). Proceeding of the International Society of Citriculture/International Citrus Congress, Novembre 9-12, Tokyo, Japan : 514-418.
- Golda D.N. E.** 2011. Evaluation des facteurs de risque épidémiologique de la phaeoramuliose des agrumes dans la zone humide du cameroun. Thèse doctorat du Centre International d'études supérieures en sciences agronomiques
- Goldschmidt E.E. et Monselise S.P.** – 1972 - Hormonal control of flowering in Citrus and some of the woody perennials. In: Plant growth substances 1970. Editeur : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Allemagne : 758-766.

- Gopal J., Minocha J.L. et Dhaliwal H.S.** – 1998 - Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports* 17 (10) : 794-798.
- Gopal J., Minocha J.L. et Sidhu J.S.** – 1997 - Comparative performance of potato crops raised from microtubers induced in the dark versus microtuber induced in light. *Potato Research* 40 (4) : 407-412.
- Gray D.G., Compton M.E., Harrell R.C. et Cantliffe D.J.** – 1995 - Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 30 : 126-151.
- Griffiths H.M., Slack S.A. et Dodds J.H.** – 1990 - Effect of chemical and heat therapy on virus concentrations in in-vitro potato plantlets. *Revue Canadienne de Botanique* 68 (7) : 1515-1521.
- Griffon M. et Loeillet D.** – 2000 - Production et consommation d'agrumes dans le monde. Evolution et Eléments de prospective. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 86 (8) : 255-275
- Guignard J.L. et Dupont F.** – 2011 – Botanique : systématique moléculaire. Editeur : Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux, France.
- HAGGMAN H., JOKELA A., KRAJNAKOVA J., KAUPPI ., NIEMI K.et ARONEN T ., 1999.** Somatic embryogenesis of scots pine : cold treatment and characteristics of explants affecting induction . *Jou.exp.Bot*, 50 ( 341) : 1769 - 1778.
- Hall I.R., Scott R.S. et Johnstone P.D.** – 1977 - Effect of vesicular arbuscular mycorrhizas on response of Grasslands Huia and Tamar white clovers to phosphorus. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 20 : 349-355.
- Hannah J., Jan B.** 2003. La multiplication végétative des ligneux en agroforesterie. *World Agroforestry Centre (ICRAF)*.
- HANNWEG K., WATT M.P .et BERJAK ., 1996.** A simple methode for the micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants . *Bot.Bull. Acad .Sin* 37: 213 - 217.
- Hassanen A.M. et Azouz M.M.** - 2003 - Propagation of *Citrus reticulata* via in-vitro seed germination and shoot cuttings. *Biologia Plantarum* 47 (2) : 173-177.
- Heller R., Esnault R. et Lance C.** – 2004 - Physiologie végétale. Tome 1 Nutrition. Editeur : Dunod, Paris, France.
- Hussey G. et Stacey N.J.** – 1981 – In-vitro propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of botany* 48 (6) : 787-796.
- Ibrahim M.A.** – 2012 - In vitro plant regeneration of local pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck.) via direct and indirect organogenesis. *Genetics and Plant Physiology* 2 (3-4) : 187–191
- Jahn O.L.** – 1979 - Penetration of photosynthetically active radiation as a measurement of canopy density of citrus trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 104 (4) : 557-560.
- Jonard R.** – 1986 - Micrografting and its applications to tree improvement. *Biotechnology Agriculture and Forestry* 1 : 31-48.
- Jones M.G.K, Outalaw W.H. et Lowery O.H.** – 1977 - Enzymic assay of  $10^{-7}$  to  $10^{-14}$  moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiology* 60 (3) : 379-383.
- JULLIEN M.,1991:** La multiplication végétative *in-vitro* , bases méthodologiques et physiologique . D.E.A . Ressources génétiques et Amélioration des plantes . INA Paris

Grignon 101p.

**Kacem N.S.** – 2005 - Embryogenèse somatique et variation somaclonale chez le blé dur et tendre (culture d'embryons matures et immatures). Mémoire de magister, Université de Constantine – Algérie.

**Karp A., Nelson R.S., Thomas E. et Bright S.W.J.** – 1982 - Chromosome variation protoplast derived potato plants. *Theoretical and applied Génétics* 63 (3) : 265-272.

**Kerboua M.** – 2002 - L'agrumiculture en Algérie. In : Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001. Editeur : CIHEAM-IAMB, Bari, Italie : 21-26.

**Khan I.** - 2007 - Citrus genetics, breeding and biotechnology. Editeur : CABI Pub. Wallingford, UK.

**Khan M.M., Alam M.A., Abbas M. et Iqbal M.J.** - 2003 - Studies on seed desiccation tolerance in four citrus species. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 40 (1-2) : 55 - 62

**Khuri S. et Moorby J.** - 1995 - Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production in-vitro. *Annals of Botany* 75 (3) : 295-303.

**Kour K. et Singh B.** - 2012 - In vitro multiplication of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.). *Journal of Agriculture and Veterinary Science* 1 (4) : 05 - 09

**Krauss A. et Marschner H.** - 1998 - Influence of nitrogen nutrition, daylength and temperature on contents of gibberellic acid and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Research* 25 (1) : 13-21.

**Labbani Z., Richard N., Buysier J.D. et Picard E.** – 2005 - Plantes chlorophylliennes de blé dur obtenues par culture de microspores isolées : importance des prétraitements. *Comptes Rendus Biologies* 328 (8) : 713–723.

**Lafon J.P., Tharaud-Prayer C. et Levy G.** – 1998 - Biologie des plantes cultivées. Tome 2 Physiologie du développement génétique et amélioration. Editeur : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.

**Lê C., Thomas D. et Nowbuth L.** – 2002 – Conservation des pommes de terre in-vitro et caractérisation des variétés cultivées en suisse. *Revue Suisse d'Agriculture* 34 (3) : 133-136.

**Lê C.L. et Abdelhamid S.** - 2004 - Microgreffage in-vitro du châtaignier. *Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture* 36 (2) : 87-92.

**Li W.B., Liu G.F. et He S.W.** - 1992 - Leaf isozymes of mandarin. In : Proceedings of the International Society of Citriculture 1 : 217–220.

**Lian Y., Dong H.R., Jin L.P., Jin Y.B., Lin H. et Zou Y.** - 1998 - Effect of inductive stimulus on the changes of endohormones during microtuber formation in-vitro in *Solanum tuberosum* L. *Advances in Horticulture* 2 : 494-498.

**Loussert R.** – 1989 - Les agrumes. Volume 2 Production. Editeur : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France : 113.

**Lüttge U., Kluge M., Bauer G.,** 1992. Botanique, Traité fondamental, traduit et adapté par Sieffert A. et V., Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.

**LÜTTGE U., KLUGE M., BAUER G.,** 2002. Botanique. Traité fondamental. Éd. Tech et Doc Lavoisier.

**Madua Assani L.G.** – 2009 - Contribution à l'analyse de la rentabilité dans le commerce des agrumes dans la ville de Kinshasa : cas des oranges. Mémoire, Faculté des Sciences Agronomiques, Unikin-Congo.

- Maïza F.** – 1980 - Analyse des aptitudes organogénétiques de plusieurs variétés de citrus en vue d'aboutir à leur multiplication *in-vitro*. Thèse de doctorat, Bordeaux, France.
- MARGARA F., 1982** : La multiplication végétative *in-vitro* .Aspects généraux B.T.I.374 L1 Agro 15:701-711.
- MARGARA F., 1989.** Bases de multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse . Ed INRA Paris 262p.
- Margara J.** – 1982 - Bases de la multiplication végétative : Les méristèmes et l'organogenèse. Editeur : Institut national de la recherche agronomique, Paris, France : 262.
- Martin C., Carre M. et Duc G.** - 1979 - Note sur les cultures de tissus de féverole (*Vicia faba* L.). Bouturage, culture de cals, culture de méristèmes. Annales de l'Amélioration des Plantes 29 (3) : 227 - 287
- Mitra G.C. et Chaturvedi H.C.** - 1972 - Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules *in vivo* grown emasculated flower buds of citrus spp. Bulletin of the Torrey Botanical Club 99 (4) : 184 - 189
- Monnier M.** – 1995 - Culture of zygotic embryos. In : *In-vitro* embryogenesis in plants. Editeur : Kluwer, Alphen-sur-le-Rhin, Pays-Bas : 117-153.
- Murashige T. et Skoog F.** – 1962 - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3) : 473-497.
- Myers S.C. et Ferree D.C.** – 1983 - Influence of summer pruning and tree orientation on net photosynthesis, transpiration, shoot growth, and dry-weight distribution in young apple trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108 (1) : 4-9.
- Nelly G. 2008.** La beauté par les huiles essentielles. Groupe Eyrolles.
- Nicolosi E., Deng Z.N., Gentile A., La Malfa S., Continella G. et Tribulato E.** – 2000 - Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100 (8) : 1155–1166.
- Niedz R.P.** – 2008 – *In-vitro* germination of Citrus seed. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 21 : 148-151.
- Nozeran R. et Bancilhon L.** – 1972 - Les cultures *in-vitro* en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. *Annales de l'Amélioration des Plantes* 22 (2) : 167-185.
- NUTI RANCHI V., 1990:** Organogenesis and embryogenesis : genetic and physiological approaches 1st International symposium *in-vitro* culture and horticultural breeding ,*Acta Horticulturae* 280: 1 - 11
- NUTI RANCHI V., 1995:** Mitosis and meiosis in cultured plant cells and their relationship to variant cell types arising in culture . *International review of cytology* 158: 65 - 139.
- Obata-Sasamoto H. et Suzuki H.** - 1979 - Activities of enzymes relating to starch synthesis and endogenous levels of growth regulators in potato stolon tips during tuberization. *Physiologia Plantarum* 45 (3) : 320-324.
- Okazawa Y.** - 1967 - Physiological studies on the tuberization of potato plants. *Journal of Faculty of Agriculture, Hokkaido University* 55 (3) : 267-347.
- OZENDA P., 2000.** Les végétaux. Organisation et diversité biologique. Éd. Dunod, Paris.
- Palmer C.E. et Smith O.E.** - 1969 - Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum* L. *Nature* 221 : 279-280.

- Parfonry R.** – 2001 - Plantes à fruits. In : Agriculture en Afrique tropicale. Editeur : Direction générale de la coopération internationale, Bruxelles, Belgique : 555-588.
- Peters A.** – 1986 - Quelques aspects de la morphogenèse des ignames cultivées in-vitro. Mémoire, Institut Supérieur des Techniques d'Outre-mer, Cergy, France.
- Polese J.M.** – 2008 - La culture des agrumes. Editeur : Artemis, Chamalières, France : 93.
- Potter R. et Jones M.G.K.** – 1991 - An assessment of genetic stability of potato in-vitro by molecular and phenotypic analysis. *Plant Science* 76 (2) : 239-248.
- Praloran J.C.** – 1971 - Les agrumes. Editeur : Maisonneuve et Larose, Paris, France : 561.
- Pruski K., Duplessis P., Lewis T., Astatkie T., Nowak J. et Struik P.C.** – 2001 - Jasmonate effect on in-vitro tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars under light and dark conditions. *Potato Research* 44 (4) : 315-325.
- Purvis A.C. et Albrigo L.G.** - 1984 - Seasonal and temperature effects on seed germination in stored grapefruit. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 97 : 100-103.
- Ramdan R., Handaji N., Beyahia H. et Ibriz M.** – 2014 - Influence of growth regulators on callus induction from embryos of five citrus rootstocks. *Journal of Applied Biosciences* 73 : 5959– 5965
- Rangan T.S., Murashige T. et Bitters W.P.** - 1969 - In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. *Proceedings of the First International Citrus Symposium, University of California, Riverside, USA* : 225 - 229
- Rebour H.** – 1948 - La culture des agrumes en Algérie. Editeur : Documents algériens : Série économique, Algeria Service d'information et de documentation 49, Alger, Algérie.
- Redenbaugh K.** – 1993 - Applications of synthetic seeds to crop improvement. Editeur : CRC Press, Florida, USA.
- Risso A. et Poiteau A.** – 1818 - Histoire naturelle des orangers. Editeur : Herissant le Doux, Paris, France.
- Rossell C.H. et Villalobos A.V.M.** – 1992 - Fondement théorique et pratiques de la culture des tissus végétaux. Editeur : Foof & Agriculture organisation, Rome, Italie.
- Rouse R.E. et Sherrod J.B.** - 1996 - Optimum temperature for citrus seed germination. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 109 : 132 - 135
- RUGHLA A et JONES M.G.K., 1998.** Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* and *S.spicatum* . *Jou.Exp Bot* 49 (320) : 563 – 571
- Saadi A.** – 1991 - Régénération de plantes de pois *Pisum sativum* L par embryogenèse somatique. Thèse de doctorat, Paris Grignon, France.
- Saidi F., Cherif H.S, Metidji H., Chaouia C., Rouibi A., Said R.M., Hamaidi M.S et Abulhussain M.S.** - 2009 - Studies on the *in-vitro* multiplication by indirect organogenesis of a medicinal plant *Aristolochia longa* L. *Agricultura* 18 (3-4) : 66-75
- SAMA A.E., SIMON Z., NYOCHEMBENG L., TAMBONG T.A., NEZANA X . et WUTAH J.G 1998:** Culture *in-vitro* et multiplication rapide de plante à tubercules et racines au Caméroune . *Cahier Agriculture* (7) :63-66. .
- Sarma C., Borthakur A., Singh S., Modi M.K. et Sen P.** - 2011 - Efficient in-vitro plant regeneration from cotyledonary explants of *Citrus reticulata* L. Blanco. *Annals of biological research* 2 (6) : 341-348.

- Sauer M.R.** – 1951 - Growth of orange shoots. Australian Journal of Agricultural Research 2 (2) : 105-117.
- Scora R.W.** - 1975 - On the history and origin of citrus. Bulletin of the Torrey Botanical Club 102 (6) : 369 - 375
- Scora R.W.** - 1988 - Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated citrus. Proceedings of the international society of citriculture 1 : 277 – 289.
- Seabrook J. et Douglass L.** – 2001 - Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. Plant Cell Reports 20 (3) : 175-182.
- Seabrook J.E.A., Coleman S. et Levy D.** – 1993 - Effect of photoperiod on in-vitro tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34 (1) : 43-51.
- Seabrook J.E.A., Douglass L.K. et Tai G.C.C.** – 2001 - Segregation for somatic embryogenesis on stem-internodes explants from potato seedlings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 65 (1) : 69-73.
- Shepard J.** – 1982 - La régénération in-vitro de plantes de pomme de terre. Pour la Science 57 : 34-47.
- Sibi M.** – 1981 - Hérité de variants épigéniques obtenus par culture des tissus in-vitro chez les végétaux supérieurs. Thèse de doctorat, Paris Sud, Orsay, France
- Singh N., Meena M.K. et Patni V.** - 2011 - Effect of plant growth regulators, explants type and efficient plantlet regeneration protocol through callus induction in *Naringi crenulata* (Roxb.) Nicolson and its biochemical investigation. African Journal of Biotechnology 10 (77) : 17769 - 17777
- Singh S., Ray B.K., Bhattacharyya S. et Deka P.C.** - 1994 - In vitro propagation of *citrus reticulata* blanco and *citrus limon* burm.f. *Horticultural Science & Biotechnology* 29 (3) : 214 -216
- Siwach P., Chanana S., Gill A.R., Dhanda P., Rani J., Sharma K., Rani H. et Kumari D.** - 2012 - Effects of adenine sulphate, glutamine and casein hydrolysate on in-vitro shoot multiplication and rooting of Kinnow mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). African Journal of Biotechnology 11 (92) : 15852-15862.
- Smith R.H., Bhaskaran S. et Miller F.R.** – 1985 - Screening for drought tolerance in Sorghum using cell culture. In-vitro Cellular and Development Biology 21 (10) : 541 -545.
- Soltner D.** - 2005 - Les bases de la production végétale-Tome III : La plante et son amélioration. Editeur : Collection Sciences et Techniques Agricoles, Bressuire - France.
- Stone B.C., Lowry J.B., Scora R.W. et Jong K.** - 1973 - *Citrus halimii* : A new species from Malaya and peninsular Thailand. *Biotropica* 5 (2) : 102 - 110
- Struik P C. et Wiersema S G.** - 1999 - Production of pre-basic seed. In : Seed Potato Technology. Editeur : Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Pays-Bas : 173-216.
- Stüssi S., Guyer U. et Zuber M.** - 2003 - Manuel pour l'introduction des auxiliaires dans les cultures sous abris. Editeur : Andermatt Biocontrol SA, Grossdietwil, Suisse : 103 p.
- Swingle W.T.** – 1943 - The botany of citrus and its wild relatives of orange subfamily (family Rutaceae, subfamily Aurantioideae). Editeur : University of California press, California, USA : 129-474.
- Swingle W.T. et Reece P.C.** – 1967 - The botany of *Citrus* and its wild relatives. In : The Citrus industry. Editeur : University of California press, California, USA : 190-430.

- Tanaka C. et Tanaka T.** – 1954 - Species problem in citrus : A critical study of wild and cultivated units of Citrus, based upon field studies in their native home. Editeur : Japanese society for the promotion of science, Tokyo, Japan.
- Téoulé E.** – 1999 - Biotechnologie et Amélioration des plantes. In : Biotechnologie. Editeur : Tec et Doc Lavoisier, Paris, France : 597-628.
- Usman M., Sana M. et Fatima B.** - 2005 - In vitro multiple shoot induction from nodal explants of citrus cultivars. Journal of Central European Agriculture 6 (4) : 435 - 442
- Van-Ee, S.** – 2005 - La culture fruitière sous les tropiques. Editeur : Fondation Agromisa, Wageningen, Pays-Bas.
- Vreugdenhil D. et Struik P.C.** - 1989 - An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*). Physiologia Plantarum 75 (4) : 525-531.
- Vreugdenhil D., Boogaard Y., Visser R.G.F. et De Bruijn S.M.** - 1998 - Comparison of tuber and shoot formation from in-vitro cultured potato explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53 (3) : 197-204.
- Walali-Loudyi D.E.M., Skiredj A. et Hassan E.** - 2003 - Fiches techniques : le bananier, la vigne et les agrumes. In : Transfert de technologie en agriculture. Editeur : Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.
- William G.H et Charles M. E.** 2003. *Physiologie végétale. De Boeck. Bruscelles.*
- Ziv M. et Altman A.** - 2003 - Tissue Culture. In Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Editeur : Academic Press, Elsevier Ltd : 1341-1353.
- Zryd J.P.** - 1988 - Culture de cellules, tissus et organes végétaux : Fondements théoriques et utilisations pratiques. Editeur : Presses polytechnique romandes, Lausanne, Suisse : 305.

## Résumé

Le présent travail a porté sur l'étude de la multiplication de mandarine (*Citrus reticulata*) par la technique de la culture *in-vitro*. L'analyse des résultats aboutit à la détermination de la meilleure technique pour la désinfection des explants. L'utilisation de l'hypochlorite de sodium à une concentration de 10% pendant un temps de 10min est le plus efficace pour la désinfection des graines et la germination est plus réussit à une température de 25°C et à l'obscurité pendant une durée de 2 à 3 semaines au maximum.

L'effet de diverses concentrations et combinaisons d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), 6 -benzylaminopurine (BAP), acide naphthalène acétique (ANA) et acide aminoisobutyrique (AIB) ont été étudiée sur régénération d'explants de mandarine (*Citrus reticulata*). L'induction de Cal a été observée sur un milieu de Murashige et Skoog (MS) avec ANA 0,5 mg /L et BAP 1 mg/L à partir des explants de tige présentant la plus haute réponse (32%). La régénération direct des pousses était la plus élevée (30%) pour l'explant de tige on milieu MS avec AIB 1 mg/L et BAP 0,1 mg/L.

**Mots clé :** micropropagation, culture *in-vitro*, *Citrus*, callogenèse, caulogenèse, phytohormone.

## Abstract

This work has focused on the study of multiplication mandarin (*Citrus reticulata*) by the technique of *in-vitro* culture. The analysis results lead determining the best technique for disinfection of explants. The use of sodium hypochlorite at a concentration of 10 % for a time of 10 minutes is the most effective for disinfecting the seeds and germination is more successful at a temperature of 25 °C and in the dark for a period 2-3 weeks.

The effect of various concentrations and acid combinations 2,4- dichlorophenoxyacetic (2,4-D), 6 -benzylaminopurine (BAP) , naphthalene acetic acid (NAA ) and aminoisobutyric acid ( AIB ) were studied in regenerating explants mandarin (*Citrus reticulata*) . Cal induction was observed on a Murashige and Skoog (MS) supplemented with NAA 0.5 mg/L BAP and 1 mg/L from stem explants having the highest response (32 %). The direct shoot regeneration was highest (30 %) in stem segment explants on MS medium supplemented with AIB 1 mg/L BAP and 0.1 mg/L.

**Key words:** micropropagation, in-vitro culture, citrus, callogenesis, caulogenesis, phytohormones.

## ملخص

ركز هذا العمل على دراسة تقنية تهجين الحمضيات بواسطة تقنية الزرع في المختبر. تحليل النتائج تاكد ان استخدام مطهر هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 10 ٪ لمدة 10 دقائق فعال لتعقيم البذور و الإنبات في درجة حرارة 25 درجة مئوية و في الظلام لفترة اسبوعين الى ثلاثة اسابيع لا اكثر.

استخدام مختلف الهرمونات بتركيزات مختلفة ك ( BAP ) 6 benzylaminopurine ، وحمض الخليك النفثالين ( NAA ) وحمض ثنائي الكلور في الزرع في الوسط الحيوى MS اعطى نتائج عالية بتركيزات 0,5 mg /L لالهرمون ANA و 1 mg /L لالهرمون BAP في تحسين و تطوير النسيج اللين. وكان التجديد المباشر على 30 ٪ لازدراع الساق على الوسط MS بتركيزات 0,1 mg /L لالهرمون AIB و 1 mg /L لالهرمون BAP

الكلمات الرئيسية : الإكثار الدقيق ، في المختبر، الحمضيات ، callogenèse, caulogenèse ، هرمون نباتي.