

Sélection *in vitro* de lignées de cals de porte-greffes d'agrumes tolérant la salinité

Abdelhadi ABOUSALIM ¹, Nour-Eddine ESSAFI ²,
Othmane ROCHDI ³ & Abdelatif RACHIDAI ³

(Reçu le 15/05/2002 ; Accepté le 26/11/2002)

إبقاء لس ل عم الحواض قاوم الملوثة ن رق زراعة الأة

قد تمت زر اة "لس" ل ن المي عم الحواض "و" و "روس رفو" و "يلا" و "روس أور" ايوم "ي و ط ذاتي عدل شمل قادر صادة ن لح "لورور دو صو دو م". ذاء، و قد أرت ر ايز الملوثة المعملية و ضوح لى قرات نمو اكس (اوزن ار ب، اوزن ايلس، الملة، اعلو)، و يمكن اار المقادير 7 و 9 رام/ ر الأة لمار اة اضغط الإيار ي. ما تميز "و" و "روس رفو" و "يلا" بمقاو اة ألى لملوثة وتم الحصول نه لى "لس" قاوم لملوثة ز ادة لى أن ذا "اكس" أة ر ام ضراء (18%) (ي او ط اغذائي الذي و ي لى 9 رام/ ر ن الملح. ماينت ادر اة دم و و د طلق بين اكس و اة المي اطعم المذور ن يماص قاو اة الملوثة.

الكلمات المفاية : و اة اطعم - لوة - زر اة الأة

Sélection *in vitro* de lignées de cals de porte-greffes d'agrumes tolérant la salinité

Les cals de deux porte-greffes d'agrumes *Poncirus trifoliata* et *Citrus aurantium*, induits en présence de 2,4-D, ont été mis en culture et subit des subcultures successives dans un milieu MS modifié additionné de NaCl dont l'application a été progressive. La concentration de sel a affecté de façon notable les paramètres de croissance mesurés (poids frais, poids sec, surface et hauteur). Les concentrations 7 g/l et particulièrement 9 g/l sont les plus sélectives. L'interaction entre la concentration de sel et le génotype est significative après trois subcultures successives et *Poncirus trifoliata* a présenté la meilleure croissance des cals. Le criblage, *in vitro*, des cals dans les conditions de stress salin a permis ainsi de sélectionner des lignées de cals de *Poncirus trifoliata* tolérants ayant même développé des pousses feuillées (18%) en présence de 9 g/l de NaCl. Une différence de comportement *in vitro* vis-à-vis du stress salin entre les cals et les jeunes plantules issues des germinations des deux porte-greffes a été notée.

Mots clés: Agrumes - Porte-greffe - Salinité - Cal - Sélection - Variation somaclonale

In vitro selection of salt tolerant callus lines of Citrus rootstocks

Calli of two Citrus rootstocks *Poncirus trifoliata* and *Citrus aurantium*, induced in the presence of 2,4-D, have been subcultured several times on modified MS medium supplemented or not, progressively, with NaCl. The concentration of salt in the medium has affected the measured parameters of callus growth (fresh and dry weight, surface, height). Levels of 7 g/l and particularly 9 g/l NaCl permitted the best screening for salt tolerance and *P. trifoliata* showed the best callus growth. The interaction between the salt concentration and the genotype is significant. *In vitro* screening of calli in the presence of NaCl permitted the selection of salt tolerant callus lines. In the presence of 9 g/l NaCl, 18% of the calli formed leafy shoots. The results obtained also suggest the absence of correlation between salt tolerance of calli and the seedlings for the two rootstocks under *in vitro* conditions.

Key words: Rootstock - Citrus - Salinity - Callus - Selection - Somaclonal variation

¹ Département d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, B.P. 6202, Madinat Al Irfane, 10101 Rabat, Maroc

² Programme Agrumes, INRA Elmenzeh, Kénitra, Maroc

³ Département de Biologie, Faculté des Sciences de Kénitra, Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc

[♠] Auteur correspondant; e-mail : a.abousalim@iav.ac.ma

INTRODUCTION

La salinité est l'une des contraintes entravant le développement de l'agrumiculture à cause de ses effets sur le rendement et sur la qualité de la production. La recherche de porte-greffes tolérant la salinité est considérée actuellement comme étant une des priorités pour le secteur agrumicole méditerranéen (Ollitraut *et al.*, 2000). La sensibilité du bigaradier, le porte-greffe prédominant au niveau de la région méditerranéenne, à la salinité est considérée comme étant moyenne. Il est à noter, aussi, que *Poncirus trifoliata* et certains de ses hybrides avec *Citrus* bien qu'ils garantissent une tolérance de l'association cultivar/porte-greffe vis-à-vis de la tristezza, sont sensibles à la salinité et à l'exocortis (Ollitraut, 1998).

L'induction de la variation somaclonale *in vitro* permet d'augmenter la variabilité génétique et peut ainsi être exploitée pour l'obtention de nouveaux cultivars et porte-greffes. Aussi, la sélection *in vitro* constitue une aide au processus d'amélioration (Gmitter *et al.*, 1992). Ces potentialités ont été exploitées pour l'obtention et la sélection de nouveaux cultivars d'agrumes (Starrantinno *et al.*, 1990; Grosser *et al.*, 2000). Les applications de ces techniques dans la recherche de tolérance ou de résistance à la salinité sont nombreuses notamment dans le cas des porte-greffes d'agrumes (Beloualy & Bouharmont, 1992; Bouharmont, 1996; Bougarfaoui, 1987), mais aussi chez d'autres espèces (Jain *et al.*, 1991; McCoy, 1987; Trivedi *et al.*, 1991).

Aussi, le présent travail a pour objectif le développement, *in vitro*, de cals de porte-greffes d'agrumes dans les conditions de stress salin, en vue de sélectionner des lignées tolérant la salinité.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La procédure adoptée pour la sélection *in vitro* de lignées de cals de porte-greffes tolérant la salinité a consisté à transférer les cals induits, en présence de 2,4-D et ayant subi plusieurs subcultures successives, sur des milieux de culture additionnés de différentes concentrations de NaCl et à évaluer l'effet de ces conditions sur leur développement. Le comportement des vitroplants issus d'embryons ayant germé *in vitro*, dans les mêmes conditions de stress salin, a également été suivi.

1. Induction et développement des cals

Les semences des porte-greffes *Citrus aurantium* (Bigaradier) et de *Poncirus trifoliata*, délivrées par l'INRA, station d'El Menzeh, ont été conservées dans des sachets en plastique, à 4°C, pour préserver leur faculté germinative. Après élimination des cotylédons, les embryons mûrs ont été mis en culture sur un milieu MS modifié (MST), dont les vitamines ont été substitués par ceux de Murashige & Tucker (1969) (MT), et additionnés de 30 g/l de saccharose et de 0,4 mg/l de 2,4-D pour favoriser l'induction des cals. Le pH a été ajusté à 5,7 et le milieu de culture solidifié par 8 g/l d'agar. L'incubation des cals, mis en culture dans des boîtes de Pétri, a lieu à l'obscurité, à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 4 semaines. Les cals ont été ensuite transférés dans un milieu frais additionné de 0,4 mg/l de BAP et de 2,4-D. L'incubation a eu lieu à la lumière (2000 Lux) sous une photopériode de 16 h. Trois subcultures ont été réalisées avant de procéder aux transferts sur des milieux en présence de sel.

2. Sélection des cals en présence de sel

Les cals, de tailles homogènes, issus des embryons des deux porte-greffes ont été transférés sur un milieu MST frais additionné de sel et des subcultures ont été effectuées toutes les quatre semaines. Afin de permettre une adaptation progressive des tissus au sel, les différentes concentrations de NaCl ont été d'abord diluées de moitié et les cultures maintenues pendant quatre semaines en culture avant de les transférer sur un milieu frais contenant les concentrations testées. Le NaCl a été testé aux concentrations 5, 7 et 9 g/l. Les cultures témoins ont été maintenues sans sel. Seuls les cals ayant montré, en présence de sel, une croissance au moins similaire à celle des cals témoins maintenus sur le milieu sans sel ont été ensuite transférés, toutes les quatre semaines, sur un milieu de culture frais contenant du NaCl aux concentrations testées. Ainsi, trois subcultures successives ont été effectuées sur ce milieu de culture.

3. Comportement *in vitro* des plantules en présence de sel

Les plantules issues des embryons des graines des deux porte-greffes, ayant germé dans le milieu MST, ont été transférés sur un milieu frais contenant 0, 5, 7 ou 9 g/l de NaCl, mais après avoir subi un prétraitement de deux mois sur un milieu contenant la moitié des concentrations de sel

testées afin de permettre leur adaptation progressive aux conditions de stress salin. Le développement des plantules a lieu sous une photopériode de 16 h, à 2000 Lux, à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

4. Observations et analyses statistiques

Les observations effectuées ont concerné les paramètres de développement des cals (hauteur, surface, poids frais (PF) et poids sec (PS)) ainsi que leurs textures (friable, compact). La croissance relative des cals (CR), en PF et en PS, a été calculée selon la formule:

$$\text{CR} = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100$$

W_0 = poids initial au temps T_0

W_1 = poids au temps T_1

Le dispositif adopté est complètement aléatoire et le nombre initial de cals mis en culture est de 18. L'analyse statistique réalisée est une analyse de la variance à deux critères de sélection (concentration de sel, génotype). Le test de Duncan ($\alpha=5\%$) a été adopté pour le classement des moyennes en cas de présence de différences significatives.

RÉSULTATS & DISCUSSION

1. Effets de la concentration de sel sur la croissance des cals

Après trois subcultures successives sur le milieu de culture additionné de NaCl, la concentration de sel utilisée a affecté de façon très hautement significative la surface, la hauteur et le PF des cals et, de façon hautement significative, le PS. Les concentrations 7 et particulièrement 9 g/l ont réduit de façon notable la surface, le PF et le PS des cals surtout après 12 semaines de culture (Figures 1, 2, 3, 4). D'autres auteurs ont aussi trouvé, dans le cas des agrumes (*Citrus sinensis*), que l'addition de NaCl (0,2 M) au milieu de culture des cellules tolérant la salinité réduit de façon notable le PF (Ben Hayyim & Kochba, 1982). Cependant, les résultats obtenus dans le cas de la tomate montrent que l'évolution de la croissance relative des cals en fonction de la concentration de NaCl est dépendante du type d'explant utilisé, bien qu'on assiste à une réduction des paramètres de croissance en présence des concentrations élevées testées (75 et 100 mM) (Bourgeois-Chaillou & Guerrier, 1992).

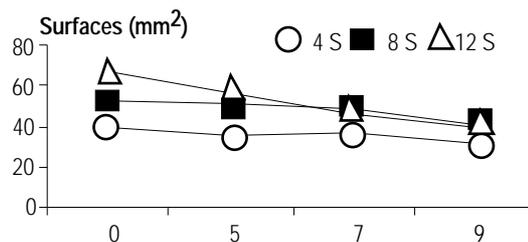


Figure 1. Effets de la concentration de sel sur la surface des cals après 4, 8 et 12 semaines (S) de culture

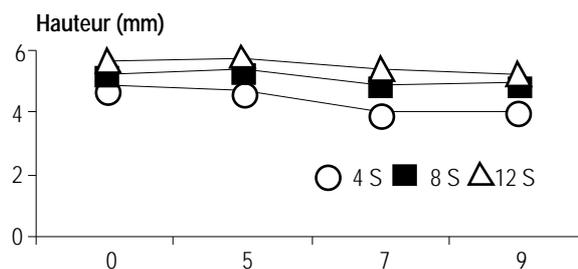


Figure 2. Effets de la concentration de sel sur la hauteur des cals après 4, 8 et 12 semaines (S) de culture

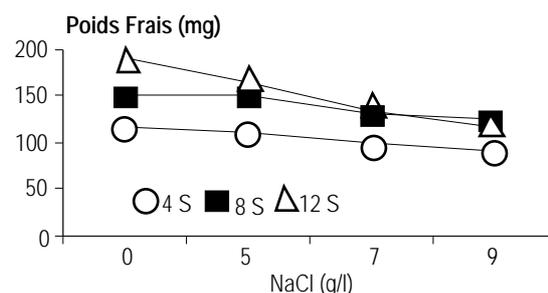


Figure 3. Effets de la concentration de sel sur le poids frais des cals après 4, 8 et 12 semaines (S) de culture

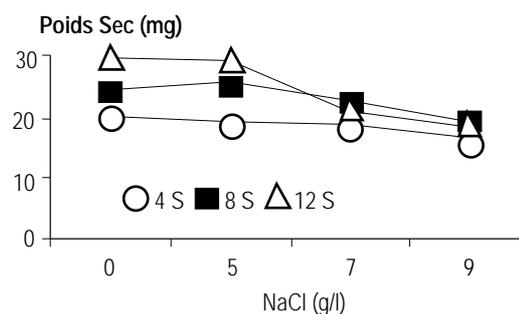


Figure 4. Effets de la concentration de sel sur le poids sec des cals après 4, 8 et 12 semaines (S) de culture

2. Effet du génotype sur la croissance des cals

Le porte-greffe *P. trifoliata* a généralement présenté le meilleur développement de cals comparativement à *C. aurantium*. La différence

n'a été significative que lors des deux premières subcultures pour la surface et la hauteur des cals (Figure 5) et lors de la première subculture pour le PF et PS (Figure 6).

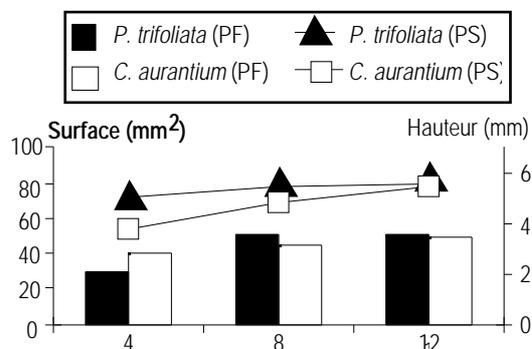


Figure 5. Évolution de la surface et de la hauteur des cals de *P. trifoliata* et de *C. aurantium* en fonction du temps de culture

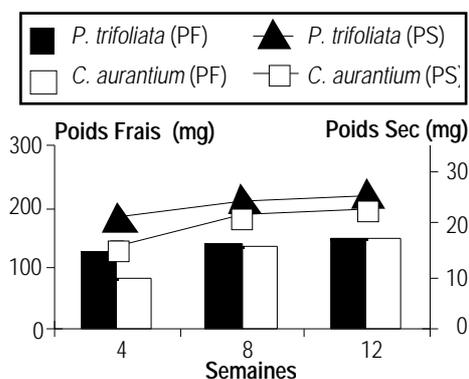


Figure 6. Évolution du poids frais et du poids sec des cals de *P. trifoliata* et de *C. aurantium* en fonction du temps de culture

3. Interaction concentration de sel x génotype

3.1. PF et PS

L'interaction entre la concentration de sel et le génotype a été significative après trois subcultures successives sur le milieu salin. Comparativement aux cultures témoins, sans sel, les concentrations 7 et 9 g/l de NaCl ont réduit de façon significative les PF et PS des cals des deux porte-greffes (Figures 8). Le taux de réduction du PF a dépassé 11% pour *P. trifoliata* et 37% pour *C. aurantium*. La réduction du PS a dépassé 19% pour *P. trifoliata* et 36% pour *C. aurantium*. En présence de ces deux concentrations 7 et 9 g/l de sel, *P. trifoliata* a présenté le meilleur développement des cals (hauteur, PF, PS) (Figures 7, 8). Il est à noter qu'après la troisième subculture, les cals de *C.*

aurantium ont dégénéré, suite à une nécrose généralisée, en présence de 9 g/l de sel. Ce niveau de nécrose n'a été que de 21% en présence de 7 g/l, alors qu'avec les cals de *P. trifoliata* il a été de 8% à 7 g/l et a atteint près de 80% à 9 g/l de NaCl. La réponse des cals des deux porte-greffes à la salinité confirme les résultats de Bouharmont en 1996. Ces réponses *in vitro* sont en accord avec le comportement au champ des deux porte-greffes vis-à-vis de la salinité, *P. trifoliata* et ses hybrides étant classés plus sensibles que *C. aurantium* (Cooper, 1961).

Les travaux réalisés sur *C. sinensis* ont montré que le PF des lignées de cellules tolérant le sel, en présence de concentrations croissantes de ce dernier, est supérieure à celle des cellules non sélectionnées. Mais le PS, rapporté au PF, est resté similaire en présence et en absence de sel (Ben Hayyim & Kochba, 1982). Ces auteurs ont aussi noté, ultérieurement, que l'évolution du PS en fonction de la concentration de sel est restée constante pour ces lignées.

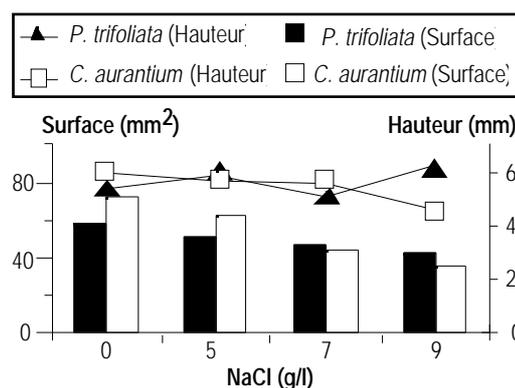


Figure 7. Effet de l'interaction concentration de sel x porte-greffe sur la surface et la hauteur des cals après trois subcultures

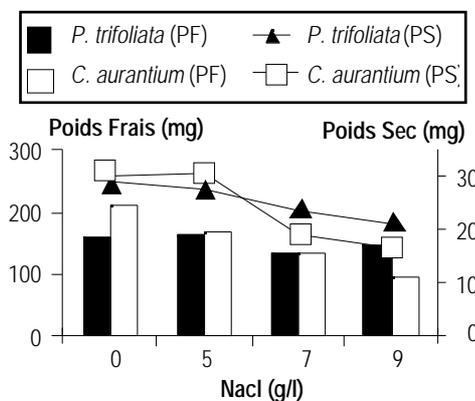


Figure 8. Effet de l'interaction concentration de sel x porte-greffe sur le poids frais et le poids sec des cals après trois subcultures

3.2. Teneur relative en eau

Sur la base des données de la teneur relative en eau des cals (rapportée au PF) (Figures 9, 10), le calcul du taux d'accroissement montre, après 12 semaines de culture (trois subcultures successives), une légère amélioration de la teneur relative en eau des cals de *P. trifoliata* en présence de toutes les concentrations de sel testées, comparativement au témoin sans sel. Le taux le plus élevé (+4,3%) est obtenu dans le milieu additionné de 9 g/l de sel (teneur relative en eau de 85,4% comparativement à 81,1% dans le cas des cultures sans sel). Par contre, dans le cas de *C. aurantium*, on observe plutôt une régression de la teneur relative en eau, comparativement au témoin sans sel, avec un taux de -3,7% en présence de 9 g/l de sel (teneur relative en eau de 82,5%). La différence entre les deux porte-greffes n'est pas significative. En d'autres termes, l'addition de NaCl dans le milieu de culture est accompagnée d'une légère absorption d'eau par les tissus de *P. trifoliata* et une légère perte d'eau par les tissus de *C. aurantium*. Cette différence semble traduire la présence d'une habilité d'ajustement du potentiel osmotique par les cellules des cals tolérant la salinité. Au niveau cellulaire, les résultats obtenus chez *C. sinensis* ont montré un développement très important des vacuoles et une réduction du volume cytoplasmique chez les cellules des lignées tolérantes, la vacuole occupant près de 90% de la cellule (Ben-Hayyim & Kochba, 1983). Dans le cas de la tomate, une absence de relation a, cependant, été notée entre la sensibilité des cals à la salinité et leur capacité à ajuster leur potentiel osmotique, la teneur en eau étant constante quelle que soit la concentration de sel testée (Bourgeais-Challou & Gerrier, 1992).

3.3. Croissance relative et développement des pousses

L'analyse de l'évolution de la croissance relative des cals en fonction de la durée de culture montre qu'on assiste, dans le cas de *P. trifoliata*, et après 12 semaines à une amélioration de l'accroissement en PF (34,4%) et en PS (14,7%) en présence de 9 g/l de sel, à la suite d'un abaissement en présence de 7 g/l. Par contre, dans le cas de *C. aurantium* l'accroissement en présence de 9 g/l de sel reste le plus faible (19,9% pour PF et 8,9% pour PS) (Figures 11, 12). Ce changement de comportement des cals de *P. trifoliata* pourrait être indicateur de développement de variants somaclonaux tolérant le NaCl après plusieurs subcultures successives

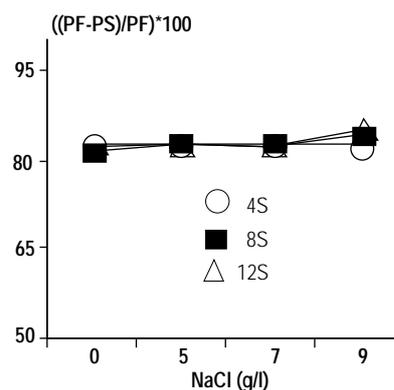


Figure 9. Effets de la concentration de sel sur la teneur relative en eau des cals de *P. trifoliata* après 4, 8 et 12 semaines (S) de culture

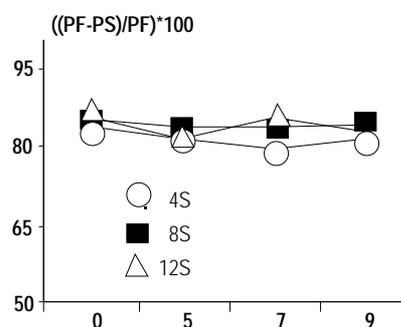


Figure 10. Effets de la concentration de sel sur la teneur relative en eau des cals de *C. aurantium* après 4, 8 et 12 semaines (S) de culture

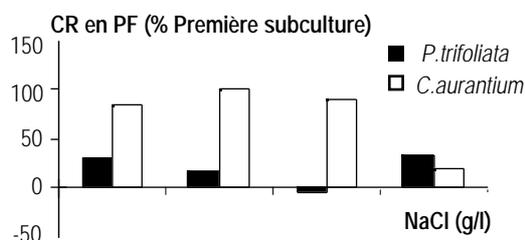


Figure 11. Effets de la concentration de sel sur la croissance relative en poids frais (% 1^{ère} subculture) des cals des deux porte-greffes

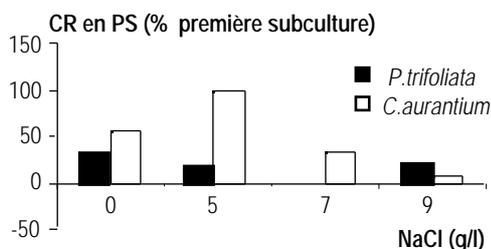


Figure 12. Effets de la concentration de sel sur la croissance relative en poids sec (% 1^{ère} subculture) des cals des deux porte-greffes

dont trois ont été réalisées sur le milieu contenant 9 g/l de NaCl. D'ailleurs, les calcs compacts de *P. trifoliata* ont développé des pousses feuillées à hauteur de 18% dans le milieu de culture additionné de 9 g/l de sel, et ces pousses présentent un meilleur développement comparativement aux cultures sans sel, ayant développé plus de 23% de pousses feuillées.

3.4. Observations morphologiques des calcs

Il est à noter, qu'après trois subcultures, l'augmentation de la concentration de sel dans le milieu de culture semble réduire le développement des calcs compacts nodulaires et favoriser le développement de calcs friables, surtout dans le cas de *C. aurantium*. En présence de 9 g/l de sel, les calcs sont surtout compacts (87,5%) dans le cas de *P. trifoliata* et friables (83,3%) dans le cas de *C. aurantium*. La salinité semble aussi affecter la compaction des calcs chez la tomate, bien que différemment (Bourgeois-Chaillou & Guerrier, 1992).

3.4. Développement des plantules en présence de sel

L'addition de 7 ou 9 g/l de sel dans le milieu de culture a sévèrement limité la croissance des plantules mises en culture *in vitro*. Le système racinaire est resté très réduit (< 1,5 cm) et aucun accroissement de la partie aérienne n'a été noté. Un développement normal des parties aérienne (> 2,5 cm) et racinaire (> 5 cm) a, cependant, été noté en présence de 5 g/l. Ce résultat traduit bien une différence de comportement *in vitro* vis-à-vis du stress salin entre les calcs et les jeunes plantules issus de la germination des embryons des espèces étudiées. Les plantules sont nettement plus sensibles au sel. Ce résultat est en accord avec ceux qui sont obtenus chez la tomate ayant montré une différence de réponse à la salinité entre les vitroplants et les calcs provenant des pousses et racines de ces mêmes plants (Bourgeois-Chaillou & Guerrier, 1992). Ces auteurs ont aussi trouvé que la réponse est fonction du type d'explant utilisé: les calcs issus des racines tolèrent plus la salinité que les calcs issus des feuilles et des tiges; inversement, les pousses des vitroplants sont plus tolérantes que les racines. Il est à noter que les informations actuellement disponibles sur les mécanismes complexes de réponse des cellules vis-à-vis du stress salin comparativement à la plante entière sont encore très limitées (Hollington, 1998).

CONCLUSION

L'application *in vitro* d'une pression sélective de NaCl, de façon progressive, sur les calcs induits en présence de 2,4-D et ayant subi plusieurs subcultures successives, a permis de sélectionner des calcs tolérant la salinité. Les calcs de *P. trifoliata* ayant survécu à cette pression sélective ont même développé des pousses feuillées plus développées que celles des calcs témoins. Auparavant, ces calcs sélectionnés ont d'ailleurs manifesté une amélioration de l'accroissement en PF et en PS à la suite d'un abaissement en présence de 7 g/l. Ces comportements pourraient être indicateurs de développement de variation somaclonale. La réalisation de test de stabilité en l'absence de pression de sélection puis en présence de stress salin permettrait de confirmer la sélection ou non de variants somaclonaux tolérant la salinité. L'évaluation vis-à-vis de la salinité du comportement des pousses régénérées *in vitro* permettrait, aussi, de supporter ou non cette sélection. Ce travail a aussi révélé la présence de différences de comportement *in vitro* vis-à-vis du stress salin entre les calcs et les jeunes plantules issus des germinations, ces dernières étant nettement plus sensibles. Au contraire, les pousses développées sur les calcs maintenus en présence de sel conservent un développement important, même meilleur que celui des calcs témoins, supportant également l'hypothèse de sélection de variants plus tolérant la salinité.

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de culture *in vitro*, Département d'Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Beloualy N & Bouharmont J (1992) NaCl tolerant plants of *Poncirus trifoliata* regenerated from tolerant cell lines. *Theor appl Genet* 83: 509-514
- Ben Hayyim G & Kochba J (1982) Growth characteristics and stability of tolerance of Citrus callus cells subjected to NaCl stress. *Plant Science Letters* 27: 87-94
- Bougarfaoui M (1987) *Variabilité induite et amélioration de la tolérance à la salinité chez les agrumes*. Mémoire, Option Horticulture, I.A.V. Hassan II, Rabat

- Bouharmont J (1996) Variation et sélection *in vitro*, tolérance à la salinité, vitrovariation, potentialités nouvelles et sélection *in vitro*. *Biotechnologies Végétales* 96: 74-79
- Bourgeois-Chaillou P & Guerrier G (1992) Salt responses in *Lycopersicon esculentum* calli and whole plants. *J Plant Physiol* 140: 494-501
- Cooper WC (1961) Toxicity and accumulation of salts in citrus trees of various root-stocks in Texas. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 74: 95-104
- Gmitter Jr FG, Grosser JW & Moor GA (1992) Citrus. *in: Biotechnology of perennial fruit crops*, Vol. 2. Hammerschlag FA & Litz RE (eds), C.A.B. International, pp. 335-369
- Grosser JW, Gmitter FG, Fleming GH & Chandler JL (2000) Applications of biotechnology to citrus cultivar improvement at the citrus research and education center. *First international citrus biotechnology symposium, Acta Horticulturae (Abstract)*, 535
- Hollington PA (1998) Technological breakthroughs in screening/breeding wheat varieties for salt tolerance. *National conference on 'Salinity management in agriculture'*, CSSRI, India, pp. 2-5
- Jain RK, Jain S & Chowdhury JB (1991) In vitro selection for salt tolerance in *Brassica L.* using cotyledon explants, callus and cell suspension cultures. *Ann Bot* 67: 517-519
- Mc Coy TJ (1987) Characterization of alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants regenerated from selected NaCl tolerant cell lines. *Plant Cell Reports* 6: 417-422
- Murashige T & Tucker DPH (1969) Growth factor requirements of Citrus tissue culture. *Proceedings of the First International Citrus Symposium* 3: 1155-1161
- Ollitrait P (1998) Apports des biotechnologies pour relever les défis posés à l'agrumiculture méditerranéenne, *in: Nouveaux acquis de la recherche en agrumiculture*, El Othmani M & Ait-Oubahou A (eds), IAV Hassan II, Agadir, pp. 12-22
- Ollitrait P, Froelicher Y, Dambier D & Seker M (2000) Rootstock breeding by somatic hybridisation for the mediterranean citrus industry. *First international citrus biotechnology symposium, Acta Horticulturae*, 535 (Abstract)
- Starrantino A, Russo F & Martelli S (1990) Initial observations on a nucellar population of 'Navelate' sweet orange obtained *in vitro*. *XXIII International Horticultural Congress, Florence, Abstract* 3055
- Trivedi S, Galiba G, Sankhla N & Erdei L (1991) Responses to osmotic and NaCl stress of wheat varieties differing in drought and salt tolerance in callus cultures. *Plant Science* 73: 227-232