

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université de Saida Dr. Moulay Tahar

Faculté des sciences

Département de Biologie



Mémoire de fin d'études Pour l'obtention du diplôme de Master en
Biotechnologie végétale

La polyembryonie et amélioration des agrumes

Préparé par : ABIDI Hadj Abdelhak

AOUALI Nour El Houda

<u>Qualité</u>	<u>Nom et Prénoms</u>	<u>Grade</u>	<u>Université</u>
Président	Pr. HACHEM Kadda	Professeur	Université de Saida Dr. Moulay Taher
Examineur	Dr. BENABDESSLEM Yasmina	Maitre de conférences « B »	Université de Saida Dr. Moulay Taher
Rapporteur	Dr. CHIKHI Amira	Maitre de conférences « B »	Université de Saida Dr. Moulay Taher

Année Universitaire: 2020 / 2021

Remerciements:

Avant tous il apparaît opportun de commencer ce mémoire par des remerciements à "Allah" puis à ceux qui nous ont beaucoup appris au cours de ce travail.

Nous tenons à exprimer note profonde gratitude à Dr. CHIKHI Amira, pour avoir proposé, suivi et diriger ce travail, mais également pour sa disponibilité, son soutien et ses qualités humaines dont nous fumes témoins;

Nous la remercions pour nous avoir fait profiter de son expérience ainsi que ses orientations constructives et ses encouragements qui nous ont été précieux, et nous ont permis de mener à bien ce travail.

Qu'il nous soit permis d'exprimer notre sincère gratitude à madame Y.HACHEM pour avoir accepté de présider et d'honorer de sa présence le jury de soutenance, qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

Nous tenons aussi à remercier Pr. K. HACHEM pour l'intérêt qu'il a témoigné à l'égard de ce travail par ses nombreuses et enrichissantes remarques et observations, enfin pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire au titre de membre de jury.

Dédicace:

Je dédie ce modeste travail:

Pour l'esprit de mon cher père Abdesslem que dieu ai son âme

*- A ma chère mère qui m'a beaucoup soutenu durant mon cursus d'études et
qui je serai éternellement reconnaissant;*

-A Mon cher frère;

-A mes chères sœurs;

-A mes neveux;

*-A mon encadreur Dr.Chikhi Amira pour son amabilité, son soutien et sa
disponibilité;*

*-A tous mes enseignants qui m'ont aidé de près ou de loin à obtenir mon
master en biotechnologie végétale.*

-A ma chère binôme Houda.

-A la promotion BTV .

Abidi hadj abdelhak

Dédicace:

Je dédie ce travail de mémoire

A mon grand-père;

A ma grand-mère;

A mon père;

A ma mère;

A mes chères sœurs;

A mon frère Abdou;

A mon binôme Abdou;

A mes chères amies ; YAMINA, FATIMA, DJIHAD, LAMIA, KHAWLA.

Aouali Nour Elhouda

Résumé:

La polyembryonie est le caractère le plus bénéfique et le plus distinct des graines d'agrumes. Cette propriété peut être bénéfique dans les programmes d'amélioration des agrumes. Les embryons nucellaires développés à partir de la paroi nucellaire dans les graines d'agrumes ainsi que les embryons zygotiques se sont avérés avoir une capacité de régénération des plantes élevée par rapport aux embryons zygotiques et qui étaient identiques à leur plante mère. Ces caractéristiques reconnaîtront les embryons nucellaires comme de solides candidats pour utilisation directe dans les programmes d'amélioration des agrumes comme isolement et fusion de protoplastes, transformation génétique, mutation induite, édition de gènes, etc.

Mots clés : Polyembryonie, agrumes, embryons nucellaires, fusion de protoplastes, transformation génétique.

Abstract:

Polyembryony is the most beneficial and distinct trait of citrus seeds. This property can be beneficial in citrus breeding programs. Nucellar embryos developed from the nucellar wall in citrus seeds as well as zygotic embryos were found to have high plant regeneration capacity compared to zygotic embryos and were identical to their mother plant. These characteristics recognize nucellar embryos as strong candidates for direct use in citrus breeding programs such as protoplast isolation and fusion, genetic transformation, induced mutation, gene editing, etc.

Key words: Polyembryony, citrus, nucellar embryos, protoplast fusion, genetic transformation.

ملخص

تعد الأجنة هو السمة الأكثر فائدة وتميزًا لبذور الحمضيات. يمكن أن تكون هذه الخاصية مفيدة في برامج تربية الحمضيات. تم العثور على الأجنة النووية التي تم تطويرها من الجدار النووي في بذور الحمضيات وكذلك الأجنة الزيجوتية ذات قدرة عالية على تجديد النبات مقارنة بالأجنة الملقحة وكانت مماثلة للنبات الأم. تتعرف هذه الخصائص على الأجنة النووية كمرشحين أقوياء للاستخدام المباشر في برامج تربية الحمضيات مثل عزالبروتوبلاست والانصهار ، والتحول الجيني ، والطفرة المستحثّة ، وتحرير الجينات ، إلخ

الكلمات المفتاحية: تعدد الأجنة ، الحمضيات ، الأجنة النووية ، اندماج البروتوبلاست ، التحول الجيني

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Résumé en français

Résumé en anglais

Résumé en arabe

Table des matières

Liste des tableaux

Listes des figures

Liste des abréviations

Introduction 01

Chapitre I: Biologie des agrumes

I.1 Origine et histoire des agrumes cultivés 04

I.2 Taxonomie des agrumes 06

I.2.1 Richesse et diversité génétique 06

I.2.2 Diversité phénotypique chez les agrumes 06

I.2.3 Classification de genre Citrus 07

I.3 Description botanique des agrumes 09

I.3.1 La partie souterraine 09

I.3.1.1 Les racines principales 09

I.3.1.2 Les racines secondaires 09

I.3.2 La partie aérienne 10

I.3.2.1 Le tronc 10

I.3.2.2 Les branches charpentières 10

I.3.2.3 Les feuilles 10

I.3.2.4 Les fleurs 10

I.3.2.5 Les fruits 10

I.3.3 Cycle de vie et système de reproduction des agrumes 10

I.3.3.1 Le cycle de vie 10

I.3.3.2	Système de reproduction	12
I.3.3.2.1	La floraison	12
I.3.3.2.2	Maturation	13
I.4	Exigences écologique	14
I.4.1	Exigences édaphiques	14
I.4.2	Exigence agro-écologiques des agrumes	14
I.5	Production mondiale des agrumes	15

Chapitre II: La polyembryonie et amélioration des agrumes

II.1	La polyembryonie	19
II.1.1	Définition générale de la polyembryonie	19
II.2	Les divers types de polyembryonie chez les citrus	20
II.2.1	Polyembryonie agamospermique	20
II.2.2	Polyembryonie agamospermique incomplète	21
II.3	Développement de la polyembryonie	22
II.4	Variation génétique de la Polyembryonie	24
II.5	Amélioration des agrumes	25
II.5.1	Objectifs d'amélioration et dispersion des gènes d'intérêt agronomique	25
II.5.2	Objectifs de l'amélioration des porte-greffes	25
II.6	Tolérance et résistance aux maladies et parasites	26
II.7	Polyembryonie	26
II.7.1	Discrimination entre plants hybrides et nucellaires	27
II.8	Apport des biotechnologies	27
II.9	Systèmes de régénération in vitro	28
II.9.1	Marquage moléculaire	31
II.9.2	Microgreffage d'apex et assainissement du germoplasme	32
II.9.3	Sauvetage d'embryons	32
II.9.4	Embryogénèse somatique	32
II.9.4.1	Étapes de l'embryogénèse somatique	32
II.9.5	Transformation génétique	33

II.9.5.1 Transformation de protoplastes	34
II.9.5.2 Transformation des agrumes à l'aide d'Agrobacterium	35
II.10 La création et la sélection de variétés chez les agrumes	36
Conclusion	38
References bibliographiques	

Liste des tableaux:

Tableau 01: Applications des outils de la biologie cellulaire et moléculaire aux différentes stratégies d'amélioration d'agrumes.....	28
--	----

Listes des figures:

Fig.01: Région d'origine, dispersion et zones de diversification des agrumes cultivés.....	05
Fig.02: Diversité pomologique des fruits d'agrumes trifoliés et caducs.....	07
Fig.03: Classification des agrumes et origine génétique des Citrus cultivés.....	09
Fig.04: cycle phénologiques des agrumes.....	11
Fig.05: Coupes transversal et longitudinal schématiques d'une clémentine.....	13
Fig.06: Répartition géographique de la production mondiale d'agrumes.....	16
Fig.07: Pourcentages de la production mondiale des principaux groupes d'agrumes commercialisés	17
Fig.08: Formation polyembryonie.....	19
Fig.09: Le clivage polyembryonie.....	22
Fig.10: Polyembryonie et germination des graines polyembryonies.....	24
Fig.11: Pousses adventives produites par des segments épicotyles de citrange Carrizo (Citrus sinensis × Poncirus trifoliata) cultivés en position (A) et repousse de microcoupe encapsulée de citrange Carrizo.....	30
Fig.12: Exemple d'utilisation de marquage moléculaire.....	31
Fig.13: Étapes de l'embryogénèse somatique.....	33
Fig.14: Obtention des agrumes à l'aide d'Agrobacterium.....	35

Fig15: Transformation de plante par Agrobacterium.....36

Liste des abréviations:

ADN: Acide désoxyribonucléique.

C: Citrus.

FAO: Food agriculture organization.

OSB: Osbeck

PCR: Polymerase Chain réactions.

RAPD: Random amplified polymorphic DNA

RFLP: Polymorphisme de nombre d'unité de répétition.

SP: espèce.

Xa21 : Xanthomonas21.

Introduction:

Les agrumes sont l'une des cultures fruitières les plus importantes et les plus largement cultivées dans le monde. L'amélioration des cultivars d'agrumes via des stratégies de sélection conventionnelles est normalement entravée par plusieurs facteurs liés à sa biologie reproductive, tels que la grande taille des arbres, haut niveau d'hétérozygotie et longue période juvénile et la polyembryonie.

Une des caractéristiques chez les agrumes est la polyembryonie nucellaire, exception faite des Cédriers, pamplemoussiers, clémentiniers et quelques mandariniers hybrides qui sont monoembryonnés. Chez les autres espèces et variétés, les graines contiennent plusieurs embryons d'origine diverse: les embryons surnuméraires (nucellaires) issus du processus apomictique en compétition avec l'embryon zygotique issu de fécondation normale des ovules l'embryonie nucellaire peut avoir des implications importantes pour les programmes d'amélioration génétique.

L'embryonie nucellaire a, en revanche, un potentiel très important pour contribuer à la multiplication et à la dissémination des variétés améliorées (Toenniessen, 2001). Chez les agrumes, elle permet la multiplication conforme par semis des porte-greffes. De plus, les arbres nucellaires sont généralement indemnes de virus car la plupart des virus et viroïdes ne sont pas transmis à l'embryon. Pour l'amélioration des porte-greffes, la sélection de génotypes avec des pourcentages élevés d'embryons nucellaires est donc essentielle pour la production de porte-greffes uniformes et conformes au plant-mère. Aujourd'hui, l'utilisation de marqueurs moléculaires permet de distinguer facilement les plants zygotiques, des nucellaires. Les nucellaires sont semblables à la plante mère, tandis que les embryons zygotiques ont tendance à être faibles et variables, et très souvent ne survivent pas car ils sont en compétition avec les embryons nucellaires pour les nutriments et l'espace.

Le nucellaire était la seule méthode pour enrayer les viroïdes des agrumes. Cependant, il y avait beaucoup de problèmes associés à la technologie nucellaire principalement l'apparition et la persistance des caractères juvéniles des plantules régénérées.

Pour développer la thématique de notre travail, nous allons montrer l'importance de la culture des agrumes (la biologie des agrumes), la polyembryonie et l'amélioration des agrumes par une recherche bibliographique.

Introduction générale

Pour cela, deux chapitres sont abordés dans cette étude. Le premier chapitre concerne la biologie des agrumes et le deuxième est consacré à l'étude de la polyembryonie et améliorations des agrumes.

Chapitre I:
Biologie des agrumes

I.1 Origine et histoire des agrumes cultivés:

Tous les auteurs s'accordent sur le fait que le pool génétique original des agrumes a pris naissance au Sud-Est asiatique il y a plusieurs millénaires. Les études phylogénétiques par Scora (1975) et Barrett et Rhodes (1976) ont suggéré que la diversité des agrumes se structure uniquement autour des trois espèces "vraies" : pamplemoussiers (*C. maxima* Merr.), mandariniers (*C. reticulata* Blanco) et cédratiers (*C. medica* L.). Des études moléculaires récentes ont conclu à l'implication d'un quatrième taxon additionnel ancestral, *C. micrantha* Wester. (Webber & al., 1967; Scora, 1975):

L'apparition des autres espèces cultivées: orangers, bigaradiers, citronniers, pomelos, limettiers, a eu lieu ensuite par hybridation entre ces taxons de base mis en contact par les échanges commerciaux et les migrations humaines.(Webber & al., 1967; Scora, 1975): Les études moléculaires supportent ce concept et ont permis de conduire aux conclusions suivantes:

- 1- L'oranger commun (*Citrus sinensis*) et le bigaradier (*Citrus aurantium*) sont considérés comme les hybrides entre les pools génétiques des pamplemoussiers et des mandariniers.
- 2- Le limettier mexicain (*Citrus aurantifolia*) résulte probablement d'une hybridation directe entre un cédratier et *C. micrantha* (un papéda).
- 3- Les citrons (*Citrus limon*) dériveraient d'une hybridation entre un cédratier et un bigaradier.
- 4- Le pomelo (*Citrus paradisi*) serait un hybride entre un pamplemoussier et un oranger.

La recherche en généalogie des agrumes est cependant complexe à cause de la grande diversité et de l'éloignement des centres d'origine. La localisation précise des zones d'origine des différentes espèces a fait l'objet de controverse.

Les zones de diversité actuelle et les études historiques témoignent en faveur de trois zones de diversification primaires des agrumes (Webber et al., 1967; Scora, 1975):

- Le nord-est de l'Inde, le nord de Birmanie et le sud de Chine seraient les zones de diversification du cédrat (*C. medica*) et d'apparition de la lime (*Citrus aurantifolia*), du citron (*Citrus lemon*), du bigaradier (*Citrus aurantium*) et de l'orange (*Citrus sinensis*).
- L'archipel Malais et l'Indonésie auraient constitués le centre d'origine du pamplemousse (*Citrus grandis*).

- Les mandariniers se seraient diversifiés sur une vaste zone couvrant le Vietnam, la Chine du sud et le Japon (Fig.01).

Le parfum, la couleur, les huiles essentielles des feuilles et des fruits des agrumes ont depuis les temps anciens suscité l'attention et la curiosité de l'Homme. De ce fait, il leur a attribués des vertus médicinales et a utilisé les sous-produits de ces plantes bien avant de commencer à cultiver celles-ci. Certains disaient même "Le fruit d'agrumes est un cadeau divin"(Calabrese, 2002).

Les premières traces d'agrumes en Chine ont été signalées dans un livre écrit durant la dynastie Chou (1027-256 avant Jésus-Christ (J-C)). L'Inde est l'autre pays asiatique où les agrumes étaient connus depuis les temps anciens

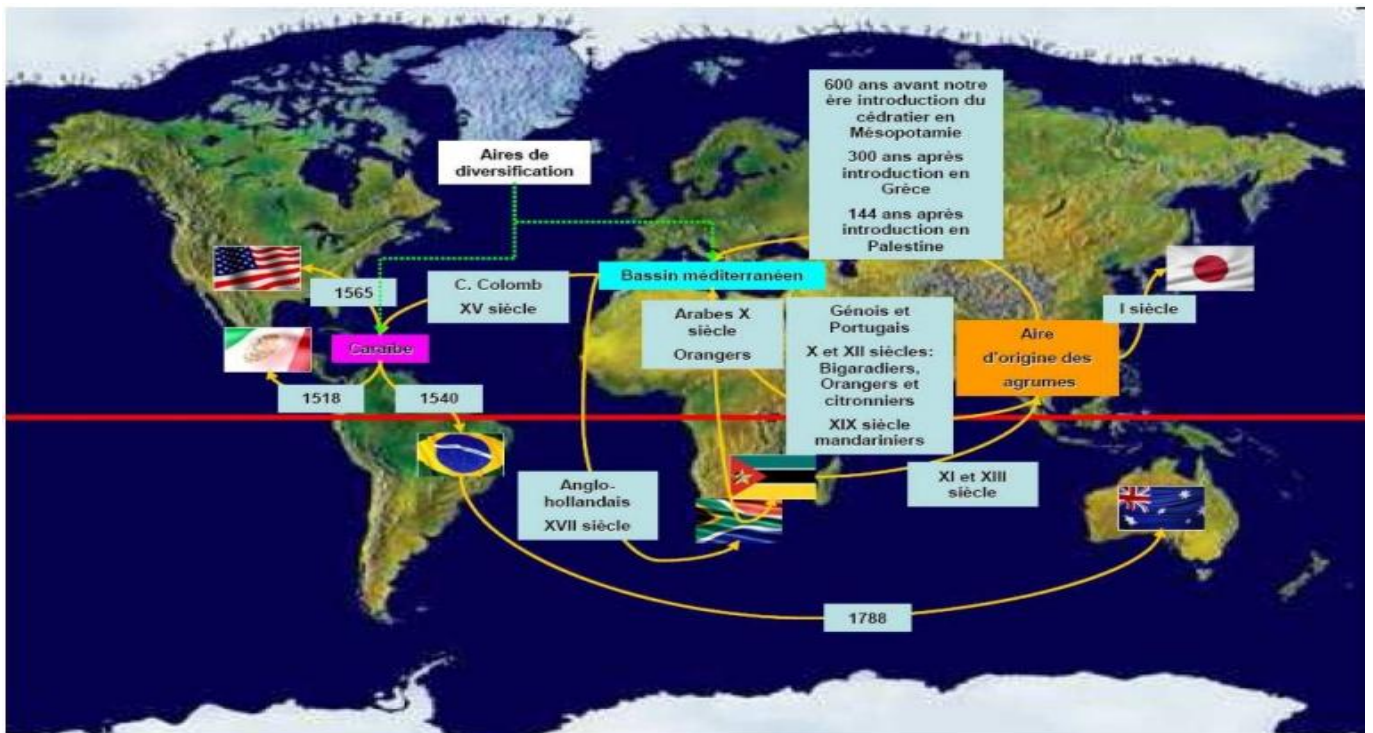


Fig1: Origine et dispersion des agrumes à travers le monde, Ollitrault et al.(2003).

I.2 Taxonomie des agrumes:

I.2.1 Richesse et diversité génétique:

Les agrumes comportent une grande diversité d'espèces. Cette diversité n'est pas complètement explorée et exploitée. En fait, les agrumes appartiennent principalement à trois genres botaniques sexuellement compatibles: *Fortunella*, *Poncirus* et *Citrus*. Ces trois genres avec huit autres genres appartiennent à la sous-tribu des *Citrinae*, tribu des *Citrinae*, sous-famille des *Aurantioideae*, famille des *Rutaceae* et l'ordre des *Géraniales* (Swingle, 1967).

Le progrès biotechnologique en termes d'outils d'analyse, de connaissances des génomes a d'ores et déjà fourni des réponses aux interrogations sur l'origine des espèces et des formes cultivées, la variabilité et la structure des populations et pourra ainsi apporter des éléments pour réviser la taxonomie des agrumes. (Jacquemond & al, 2013; Luro & al, 2013; Penjor & al. 2013; Curk & al, 2015.).

En référence à la classification de (Swingle, 1967), on distingue huit principaux groupes taxonomiques : *C. medica* (L.) (cédratiers), *C. reticulata* Blanco (mandariniers), *C. maxima* (L.). (Pamplemoussiers), *C. sinensis* (L.), (orangers), *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. (limettiers), *C. paradisi* . (pomelos), *C. limon* (L.) Burm. F. (citronniers), *C. aurantium* (L.) (Bigaradiers).

La diversité génétique au sein des agrumes se traduit par une variabilité des caractères morphologiques ou de couleur (Fig.03), organoleptiques mais aussi des résistances aux facteurs biotiques et abiotiques. En plus de cette variabilité agro-morphologique, les agrumes se caractérisent par une variabilité biochimique et moléculaire souvent utilisée pour étudier les relations phylogéniques entre les différentes espèces (Ollitrault et al. 1999).

I.2.2 Diversité phénotypique chez les agrumes:

La diversité agro morphologique des agrumes est considérable. Elle concerne aussi bien les caractères organoleptiques et pomologiques que les résistances aux facteurs biotiques ou abiotiques (**Fig.02**). Ainsi, cette diversité ouvre des perspectives intéressantes pour l'utilisation des ressources génétiques en amélioration variétale. Elle est fortement marquée entre les espèces.

Cette variabilité se manifeste particulièrement au niveau des fruits. Le diamètre des fruits peut varier de quelques millimètres chez certains kumquats et micrantha à plus de 30 centimètres pour certains pamplemoussiers.

La coloration du fruit, due à la présence de métabolites secondaires, les flavonoïdes (anthocyanes) et/ou les caroténoïdes (lycopène, bêta carotène, volaxanthine...) varie du jaune/vert chez les limettiers, les cédratiers, les citronniers, les pamplemoussiers au rouge/orange chez les orangers et mandariniers voire au violacé chez les Microcitrus. La pulpe peut également présenter des couleurs et des teneurs en acidité variables entre les espèces. Les agrumes présentent un port variable en fonction des espèces allant du buisson à l'arbre.



Fig.02: Diversité pomologique des fruits d'agrumes : A = les cédrats ; B = les pomelos ; C = les oranges ; D = les limes ; E = les mandarines et F = les citrons. Au niveau foliaire, les feuilles des Citrus sont majoritairement monofoliées, persistantes et présentent des tailles et formes variables suivant les espèces. Seuls les Poncirus se caractérisent par des feuilles totalement trifoliées et caduques.

I.2.3 Classification de genre Citrus:

D'après Jacquemondet *al.* (2009) beaucoup de travaux ont été réalisés au cours du XXème siècle afin de classer les différentes variétés et espèces, il est admis que les agrumes se répartissent en trois genres botaniques, compatibles entre eux: Poncirus, Fortunella et

Citrus. Ces trois genres appartiennent à la tribu des Citeuses. Les Poncirus ne produisent pas de fruits consommables, mais sont utilisés comme porte-greffe car ils confèrent certaines résistances intéressantes. Les Fortunella produisent des petits fruits qui se dégustent avec la peau.

La position taxonomique (Swingle, 1971) des agrumes est la suivante: (Fig03). Classification de Cronquist (1981):

Règne: Plantae

Sous-règne: Tracheobionta

Division: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sous-classe: Rosidae

Ordre: Sapindales.

Famille: Rutaceae

Genre: Citrus.L

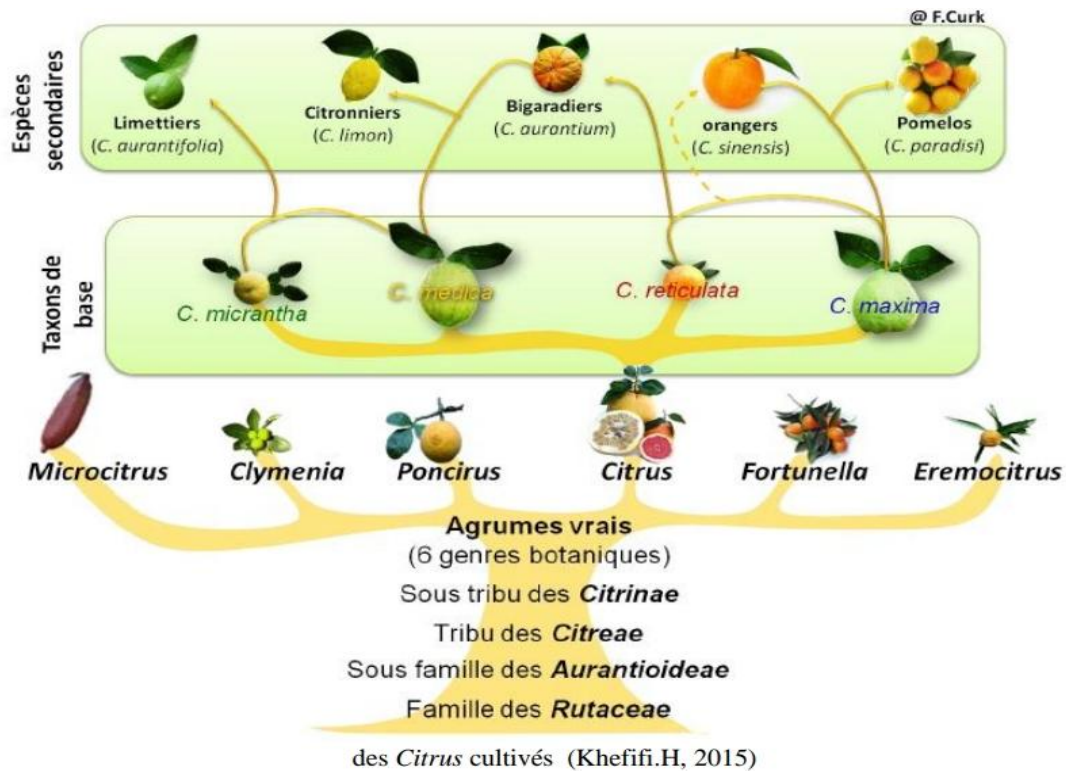


Fig.03: Classification des agrumes et origine génétique des Citrus cultivés (khefifi, 2015).

I.3 Description botanique des agrumes:

Les agrumes sont composés de deux parties: la partie souterraine qui forme le porte-greffe et la partie aérienne (greffon) qui porte les fruits de la variété de l'espèce cultivée.

I.3.1 La partie souterraine:

I.3.1.1 Les racines principales: les racines sont très solides et ont également pour fonction de maintenir au sol un arbre généreux dont la frondaison présente, par sa persistance et son abondance, une forte prise au vent;

I.3.1.2 Les racines secondaires: elles absorbent les éléments minéraux indispensables à l'alimentation de l'arbre en éléments nutritifs (Richard, 2004).

I.3.2 La partie aérienne:

I.3.2.1 Le tronc: On greffera sur ce dernier, à quelques dizaines de centimètres du sol, la variété choisie. Le tronc conduit, vers la frondaison, la sève riche en éléments minéraux.

I.3.2.2 Les branches charpentières: Elles prennent naissance sur le tronc et restent limitées par la taille au nombre de trois ou quatre et porteront les sous mères, qui porteront à leur tour les rameaux végétatifs et les rameaux fructifères.

I.3.2.3 Les feuilles: Selon les espèces et les variétés, mais aussi selon l'âge et la taille, les feuilles présentent des formes et des tailles très diverses. Plus larges et plus grandes, celles du citronnier sont aussi plus claires que celles de l'oranger, ovales et d'un vert sombre.

I.3.2.4 Les fleurs: Le calice de la fleur du citron est constitué de 3 ou 5 sépales verts, de 5 pétales plus généralement blanc chez l'oranger, ou pourpres pour ceux du citronnier.

Les étamines au nombre de 20 à 30 sont soudées à leur base par groupes de trois ou quatre. Le pistil est formé de plusieurs carpelles. L'ovaire constitue la base du stigmate sur lequel se fixera le pollen libéré au printemps.

I.3.2.5 Les fruits: Ils varient selon les espèces et les variétés et présentent des poids et des tailles variables.

I.3.3 Cycle de vie et système de reproduction des agrumes:

I.3.3.1 Le cycle de vie: Le cycle de vie de ces arbres débute par une phase de dormance suivi par une phase de débourrement ou il y a le gonflement des bourgeons et le développement des feuilles suivis par une phase de floraison (début, pleine et fin). La Figure 04 récapitule les différents stades phénologiques.

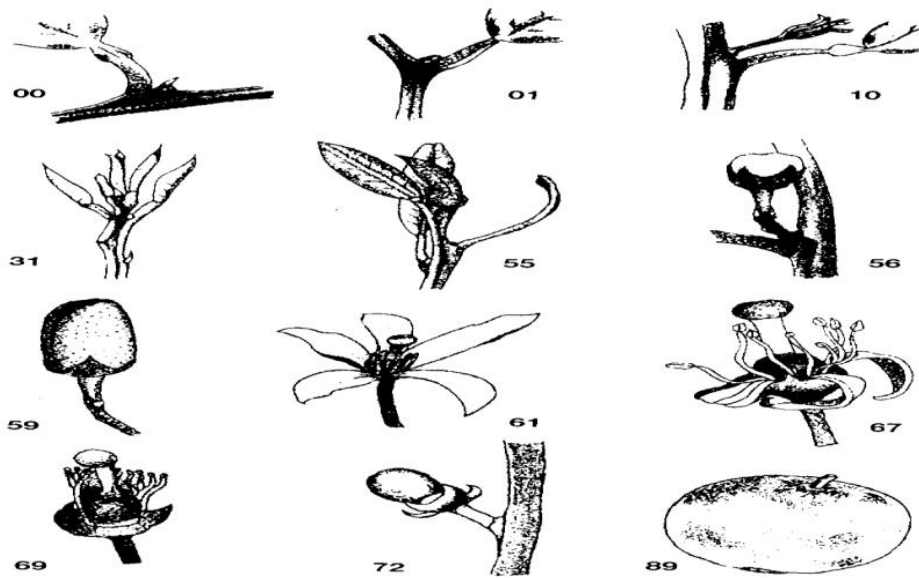


Fig.04: cycle phénologiques des agrumes (Agusti et *al.*, 1995).

00 : Début de dormance : stade de dormance.

01 : début du gonflement des bourgeons : stade développement des bourgeons.

10 : Séparation des premières feuilles : stade de développement des feuilles.

31 : début de la croissance des pousses: stade développement des pousses.

55 : les fleurs sont visibles mais encore fermées : stade d'apparition de l'inflorescence.

56 : les pétales s'allongent les sépales entourent la moitié de la corolle (stade bouton blanc) : stade de développement de l'inflorescence.

59 : La plupart des fleurs avec des pétales formant une boule creuse : stade d'apparition de l'inflorescence.

61 : début floraison (environ 10% des fleurs sont ouvertes): stade de floraison.

67 : les fleurs sont flétries (la majorité des pétales sont tombés): stade de floraison.

69 : Fin floraison (tous les pétales sont tombés) : stade de floraison.

72 : le fruit vert est entouré par les sépales en forme d'une couronne : stade de développement du fruit.

89 : Le fruit a atteint la maturité demandé pour la consommation avec son gout et sa consistance caractéristique : maturation du fruit et d la graine.

I.3.3.2 Système de reproduction:

I.3.3.2.1 La floraison: Les agrumes sont caractérisés par une floraison abondante. Pour la majorité des espèces, elle a lieu en début de printemps dans l'hémisphère nord, néanmoins certaines variétés telles que le citronnier Eureka, sont capables de fleurir plusieurs fois par an.

La période de floraison pour une même variété peut varier d'une zone géographique à une autre et selon les températures au moment de l'induction florale en fin d'hiver. En revanche, les *Poncirus* fleurissent plus précocement (un mois plus tôt) et le développement des bourgeons floraux précède celui des bourgeons végétatifs. Les agrumes du genre *Fortunella* possèdent la floraison la plus tardive, soit environ deux mois après la floraison des citrus. Ces écarts de précocité de floraison contribuent à l'accroissement de la différenciation génétique entre ces trois genres.

La fleur est de type hermaphrodite, formée de 3 à 5 sépales qui constituent le calice, de 4 à 8 pétales blancs ou légèrement pourpres qui constituent la corolle et enfin des appareils reproducteurs mâles (étamines) et femelles (pistil et stigmate).

Chez certaines espèces comme *Poncirus trifoliata*, *Citrus limon*, *C. aurantifolia* et *C. medica*, le pistil peut être absent ou atrophié chez un bon nombre de fleurs. La proportion de fleurs portant des anthères vides est également variable suivant le cultivar et les conditions de culture.

Le stigmate est réceptif quelques jours avant l'anthèse et plusieurs jours après. Chez certains cultivars, l'autopollinisation est facilitée par la proximité entre l'anthère et le stigmate ou par la déhiscence précoce des anthères. Cependant, l'allopollinisation par le biais d'insectes est la stratégie la plus commune grâce au pouvoir attractif des fleurs (l'attrait de la corolle, le parfum, le nectar abondant, le pollen). On assiste à une chute de fleurs et de jeunes

fruits tout juste noués souvent dans des proportions importantes (90% chez le citronnier, 95% chez l'oranger et le clémentinier).

I.3.3.2 Maturation: Tous les fruits des citrus ont la même structure. Seuls la dimension et la forme changent d'une espèce à une autre. Il s'agit d'un point de vue biologique d'une baie charnue. Le fruit est composé de deux parties: la peau également appelée péricarpe et la pulpe appelée aussi endocarpe. Le péricarpe est composé d'un épicarpe qui correspond au flavédo et d'un mésocarpe qui correspond à l'albédo. Le flavédo représente la partie externe colorée (vert, jaune, orange...) contenant les glandes à huiles essentielles (**Fig.5**).

L'albédo quant-à-lui représente la partie interne de la peau composée de tissus spongieux de couleur blanchâtre. Au milieu de l'endocarpe se trouve l'axe central du fruit (columelle) qui est entouré par les segments. Ces derniers sont composés de vésicules à jus nommés aussi sacs à jus (Salunkhe & Kadam, 1995; Spiegel-Roy & Goldschmidt, 1996; Ladanyia, 2008).

Un fruit d'agrumes mûr est le produit final d'un ensemble d'événements qui commencent par la formation des structures reproductives: bourgeons, fleurs, petits fruits et finit par la formation des fruits mûrs. Ces événements s'étalent sur une période allant de six à douze mois en fonction du climat (Sinha *et al*, 2012).

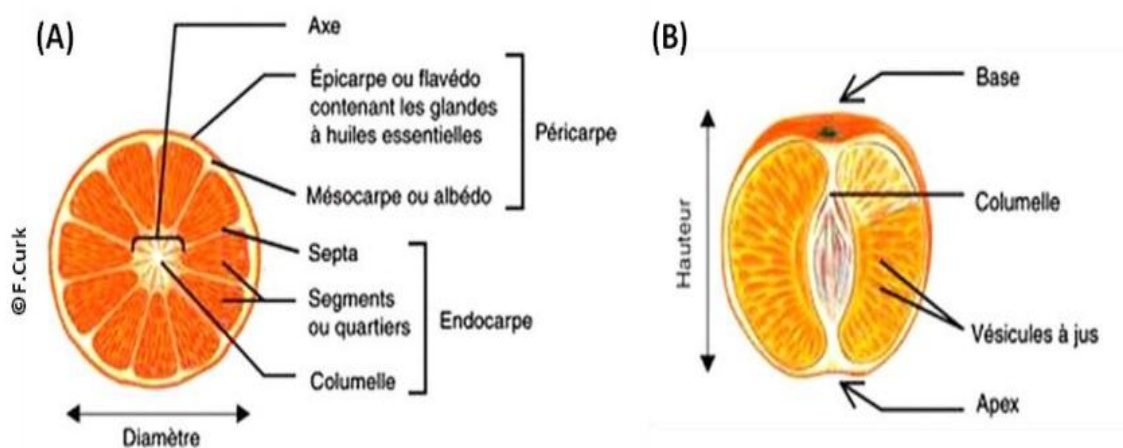


Fig.05: Coupes transversal(A) et longitudinal (B) schématiques d'une clémentine. L'augmentation du volume du fruit est due essentiellement à la croissance des segments de la pulpe (Wardowski *et al*. 1986; Spiegel-Roy *et* Goldschmidt, 1996).

-Caractérisation de la maturation:

La maturation des fruits correspond à un ensemble de changements biochimiques (accumulation importante des sucres solubles et des acides organiques) et physiologiques qui conduisent le fruit à son état de maturité physiologique, ou commerciale quand il s'agit de variétés cultivées, et qui lui confère ses caractéristiques organoleptiques sensorielles: arômes, goût, couleur, jutosité... (Kader, 1997; Iglesias et al, 2007).

Les agrumes sont des fruits non-climactériques. Ils se récoltent à maturité lorsque leurs qualités organoleptiques sont les plus proches des standards de consommation de chaque variété. En effet leur goût ne s'affine pas après la cueillette, bien au contraire. Ils ne manifestent pas de crise respiratoire ni de synthèse intense d'éthylène induisant un processus de mûrissement après récolte (Sinha et al., 2012).

I.4 Exigences écologique:**I.4.1 Exigences édaphiques:**

Selon Loussert (1989), les qualités essentielles d'un bon sol agrumicole sont:

- 1- La perméabilité varie de 10à 30Cm/h.
- 2- Le sol doit avoir un ph qui se situe entre 6 et 7.
- 3- La plantation doit être à 4 ou 5 m d'écartement.
- 4- Le taux de calcaire compris entre 5 à 10%.
- 5- Une bonne teneur satisfaisante en P2O5 et K2O assimilables.

I.4.2 Exigence agro-écologiques des agrumes:

a. La température: Les agrumes sont considérés comme des arbres à climat chaud, néanmoins, les températures minimales et maximales constituent un facteur limitant. Le zéro végétatif des agrumes est de 13°C. La température optimale de croissance serait de 25à 26°c ; au-delà, l'activité décroît pour s'arrêter aux environs de 38 à 40°c (Loussert, 1989).

b. L'humidité de l'air: Selon le même Auteur la transpiration du végétal est élevée et ses besoins en eau augmentent. Cette faible humidité de l'air peut être amplifiée par des vents chauds desséchants pouvant provoquer des brûlures sur le feuillage et les fruits.

c. Vent: Il est l'ennemi redoutable des citrus. Les vents fort et froids provoquent la chute des fleurs, des fruits, des feuilles et arrivent même à dégarnir les rameaux. Il cause de grands dommages surtout au moment de la chute biologique et la récolte (Mahmudi, 2012).

d. Sol: Les agrumes se développent bien en sols légers, perméables, profonds et sains. En cas des sols argileux, il vaut mieux installer un système de drainage ou pratiquer la culture sur ados afin de favoriser une bonne aération du sol.

Les agrumes craignent les sols riches en calcaire actif, le taux de ce dernier ne doit pas dépasser 12 % (et pas plus de 5 % pour le porte greffe du genre poncirus). Le pH du sol doit être voisin de la neutralité (entre 6 et 7).

En pH alcalin, l'absorption des oligo-éléments, devient déficiente et les agrumes manifestent des carences en ces éléments (Mahmudi, 2012).

e. Eau: Les agrumes sont des cultures d'origines tropicales, donc sont exigeantes en eau. Une moyenne de 1200 mm par ans est nécessaire pour le bon déroulement du cycle de culture dans le bassin méditerranéen.

Les agrumes sont sensibles à la salinité, une eau de bonne qualité ne doit pas contenir plus de 1.5 de résidu sec par litre (avec un taux de chlorure de sodium inférieur à 1g/ litre). Les agrumes craignent la stagnation d'eau qui cause l'asphyxie des racines et la maladie de gommose pour les portes greffe sensibles. Condition (stagnation) qui se présente en cas des sols lourds (Mahmudi, 2012).

I.5 Production mondiale des agrumes:

Les agrumes constituent, en volume, la première production fruitière mondiale et devançant ainsi celle des raisins et des bananes. L'aire agrumicole actuelle est elle-même très vaste; elle se situe approximativement entre la 40° latitude N et S, tout autour du monde. La superficie totale plantée en agrumes est évaluée à plus de 3M ha (**Fig.06**).

Les principaux pays producteurs sont la Chine, Bassin méditerranéen, la Brésil et les États-Unis.

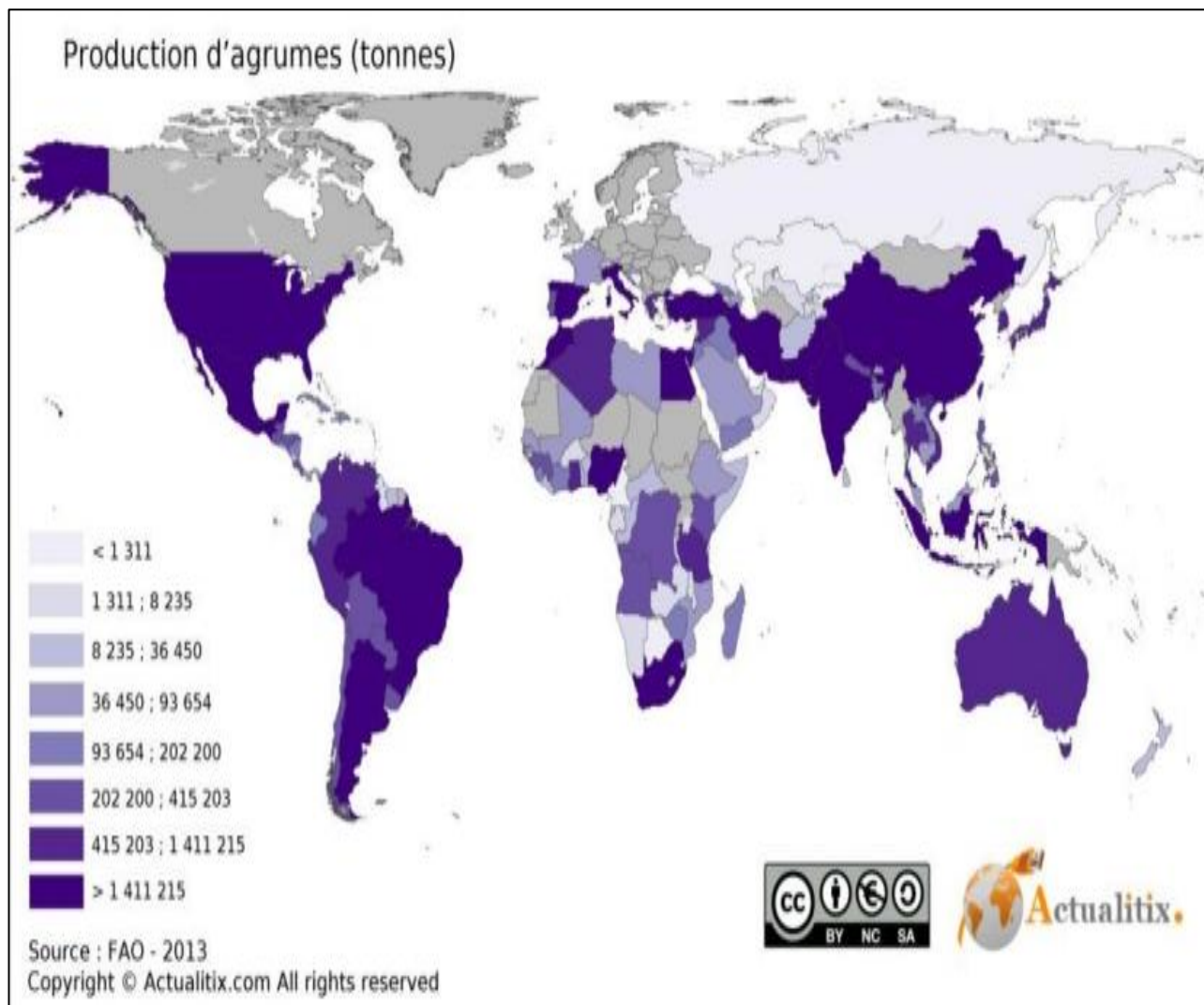


Fig.06: Répartition géographique de la production mondiale d'agrumes (FAO, 2013)

Les oranges représentent la plus grande part de cette production (71 %); suivent les citrons et les limes (13%), les petits agrumes - tangerines, mandarines, clémentines (10%) et les pomelos (6%). Le volume de fruits transformés, en constance augmentation, est évalué à 35% de la production totale.

En 2012, la production mondiale a dépassé les 131 millions de tonnes (FAO, 2013). Les oranges représentent de loin la plus grosse production d'agrumes avec un pourcentage de 52%.

Les petits agrumes occupent le deuxième rang avec une production de 20.6 millions de tonnes, représentant 21% de la production totale d'agrumes. Suivent ensuite les limes et les citrons, les autres agrumes et pour finir les pomelos. Ces derniers occupent la dernière place

avec une production de 6.1 millions de tonnes. En 2012, la production mondiale a dépassé les 131 millions de tonnes (**Fig.07**).



Fig.07: Pourcentages de la production mondiale des principaux groupes d'agrumes commercialisés pour l'année 2012 (FAO, 2014).

Chapitre II:
La polyembryonie et amélioration des
agrumes

II.1 La polyembryonie:

II.1.1 Définition générale de la polyembryonie:

Le terme de la polyembryonie est ici pris dans son sens la plus large, savoir: le fait pour une graine de présenter deux ou plusieurs ébauches embryonnaires pouvant se développer ou non en embryons complets et même en jeunes plantules lors de la germination (**Fig.07**). Cette définition qui mériterait quelques explications; de recouvrir l'ensemble des phénomènes qui peuvent se produire, quelles que soient l'origine, la nature et les modalités de développement des embryons (Leroy, 1947).

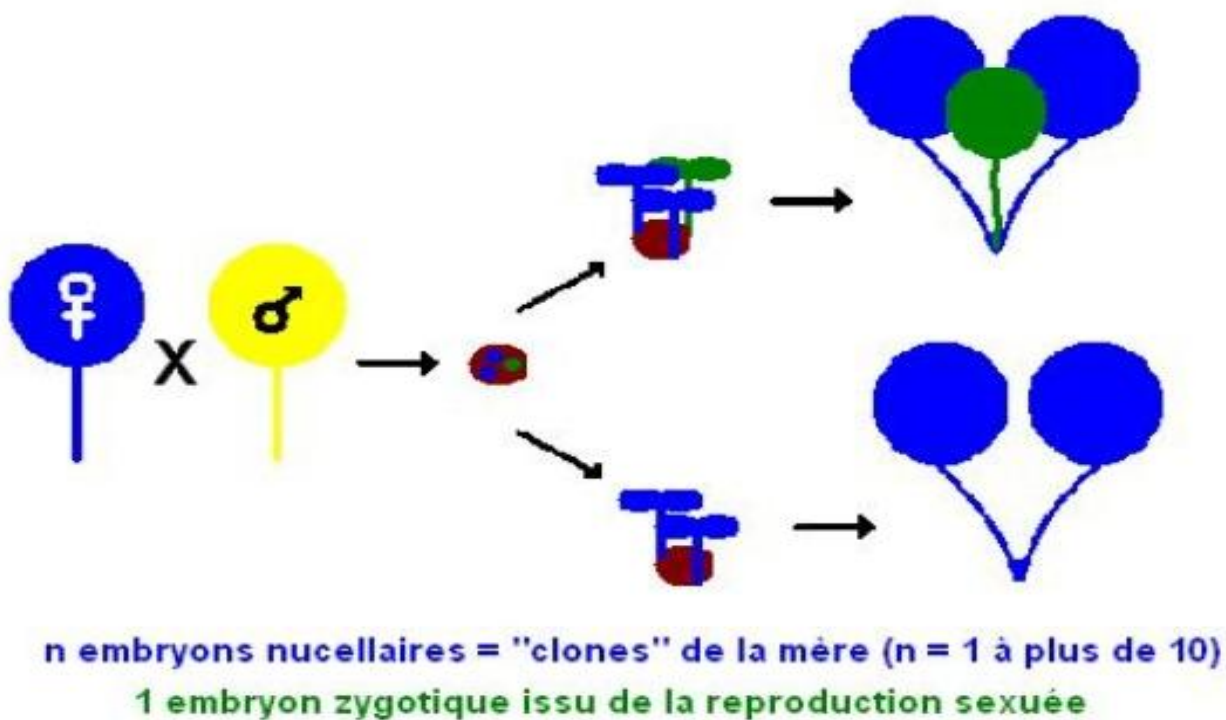


Fig.08: Formation polyembryonie. (Pomum.fr)

II.2 Les divers types de polyembryonie chez les citrus:

La polyembryonie est basée sur le type de fécondation, les citrus présentent deux catégories suivantes:

II.2.1 Polyembryonie agamospermiq:

Ce phénomène est encore très mal connu chez les citrus. Au cours de recherches expérimentales, certaines graines donnent chacune deux plantules hybrides identiques par clivage ou bourgeonnement d'un œuf fécondé (clivage polyembryonie)(**Fig.09**). Chez les citrus une telle division de l'embryon peut donner jusqu'à quatre plantules, une fréquence de 10 cas sur 1 000 environ.

La polyembryonie par clivage a été relevée dans certaines variétés, des espèces suivantes: *C. reticulata*, *C. sinensis* (L.) Osbeck, *C. paradisi*.

Des auteurs ont observé plusieurs cas d'ovules présentant deux gamétophytes normaux et qui après fécondation des oosphères auraient vraisemblablement donné naissance à deux embryons d'origine amphimictique par ovule. Ce dernier cas expliquerait la formation d'hybrides non identiques à partir d'une même graine.(Bot. G, 1943).

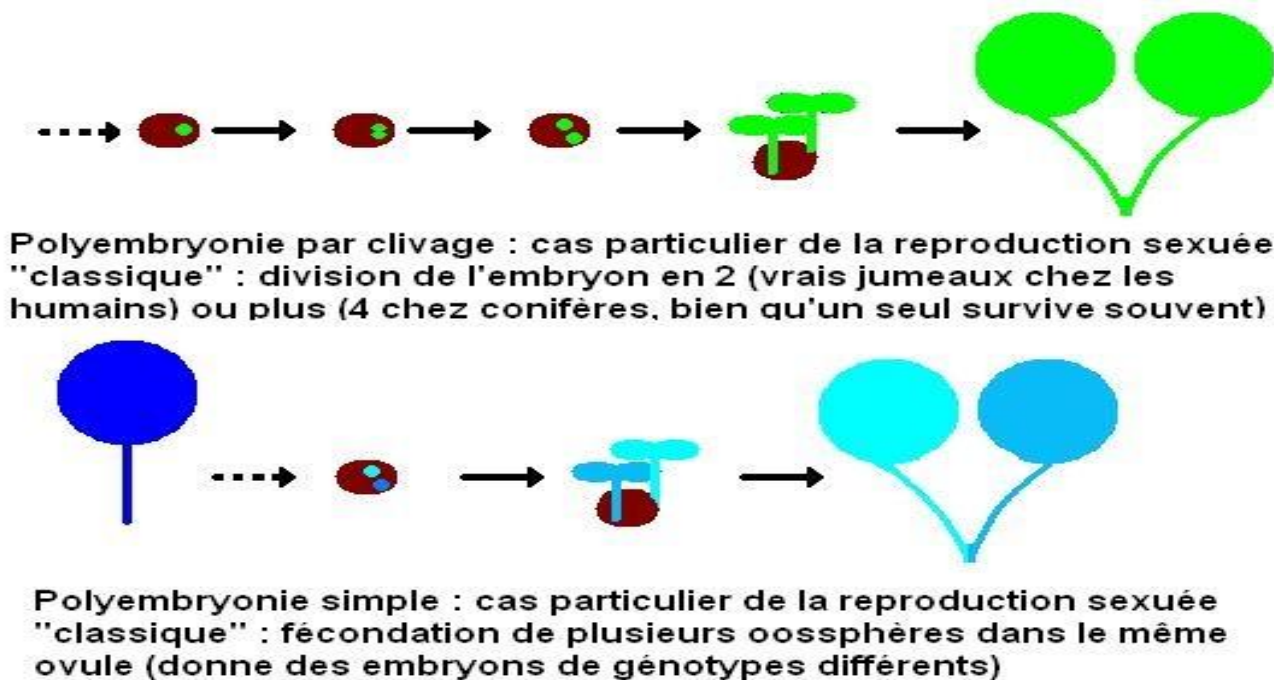


Fig.09:Le clivage polyembryonie. (Pomum .fr).

II.2.2 Polyembryonie agamospermiq ue incomplète:

Il y a des variétés où celui-ci avorte très rapidement, et seuls des embryons nucellaires se développent. Du point de vue de l'évolution semble que ces dernières soient les plus avancées chez lesquelles la dégradation de la sexualité s'accroît. Il existe de même chez les Manguiers des variétés qui ont perdu toute faculté de pouvoir se reproduire sexuellement. Mais chez ces dernières, la fécondation n'a pas lieu.(W. T. Swingle (1927)).

Chez les citrus, la question reste posée de savoir si la pollinisation et la fécondation sont toujours des conditions à l'induction embryonnaire des cellules nucellaires. De façon générale, il est certain que ces deux opérations sont exigées. Mais il n'est pas absolument sûr que certaines variétés n'aient pas acquis leur autonomie par une reproduction partielle (sans fécondation) ou même totale (sans pollinisation), quoique ce dernier cas soit assez improbable. En bref, la polyembryonie agamospermiq ue stricte existe peut-être chez certaines variétés de citrus, mais elle n'a pas été prouvée (Leroy, 1947).

Cette polyembryonie est extrêmement répandue chez les citrus et pratiquement c'est la seule qui soit importante.

Voici en gros comment les choses se passent: A un moment déterminé, variable suivant les cas par rapport aux premières divisions du zygote, certaines cellules du nucelle, situées dans le voisinage du sac embryonnaire, généralement dans la région du micropyle, entrent en division et donnent des embryons qui ne tardent pas à pénétrer dans le sac embryonnaire.

Ces cellules du nucelle se distinguent des cellules basale en ce qu'elles sont plus grandes, avec un plus gros noyau et un cytoplasme plus dense.(W. T. Swingle, J. P. Torres, Sokol'skaja,H. P. Traub).

Les études scientifiques ont observé que les plantules adventives présentent toutes les caractéristiques des plantules ordinaires issues de l'œuf fécondé, savoir la vigueur végétative.

Une notre étude scientifique note cependant qu'on peut distinguer les embryons nucellaires jeunes par leur forme irrégulière et l'absence de suspenseur. Ce sont là des différences minimales (le suspenseur n'est qu'un élément transitoire). Il doit se produire une sécrétion hormonale à partir du sac embryonnaire, laquelle stimule le développement des embryons adventifs et confère aux tissus somatiques plus ou moins sénescents une nouvelle vigueur. La situation des embryons adventifs au voisinage du sac permettrait à ceux-ci, de profiter d'un milieu physiologique particulier à la graine au moment de l'embryogénèse, attiré l'attention sur le fait que le gamétophyte mâle pouvait avoir une influence importante sur le tissu maternel environnant (Leroy, 1947).

II.3 Développement de la polyembryonie:

Le phénomène de polyembryonie a été découvert en 1719, où deux germinations se développent à partir de la même graine du citrus. Ce phénomène est appelé de polyembryonie nucellaire ou adventive.

Des études embryologiques menées aux XIXe et XXe siècles ont démontré que les embryons adventifs présents dans la graine en plus de l'embryon sexuel peuvent se former sur la base de différentes structures d'ovules et de structures de sac embryonnaire.

Le matériel disponible sur la polyembryonie appelé pour la nécessité de systématiser ces données. Le premier système a été proposé, qui a décrit quatre voies possibles de formation d'embryons adventifs à la suite de la fusion de deux ou plusieurs ovules, le développement de plusieurs sacs embryonnaires dans le même ovule, ou à la suite de la division de pro embryon.

La classification était basée sur le nombre de sacs embryonnaires, dans lesquels les embryons adventifs développés. Sur cette base, il distingue le vrai de la fausse polyembryonie. Le premier comprend la formation d'embryons adventifs de synergides et d'antipodes et à partir de cellules de la mère (nucelle, tégument) ou sporophyte fille à l'intérieur du même sac embryonnaire. Ce dernier comprend la formation d'embryons adventifs dans plusieurs sacs embryonnaires provenant de mégasporophytes de différents noyaux dans un ou plusieurs ovules ou de mégaspores sœurs, ainsi qu'en cours de développement des sacs embryonnaires des cellules nucellaires.

Dans d'autres études sur la polyembryonie et le développement de nouveaux systèmes, sa division en vraie et fausse polyembryonie a suscité de vives discussions. (Batygina, TB et Vinogradova, GY (2007). Le problème de la nature des embryons est très important. Dans les nouvelles classifications, gaméophytique (à partir de cellules gaméophytes) et sporophytique (à partir de cellules de mère et sporophyte fille) polyembryonie ont été discriminées; ont proposé de distinguer « unisaccal » et « plurisaccal » polyembryonies dans le groupe gaméophytique (Batygina et Vinogradova, 2007).

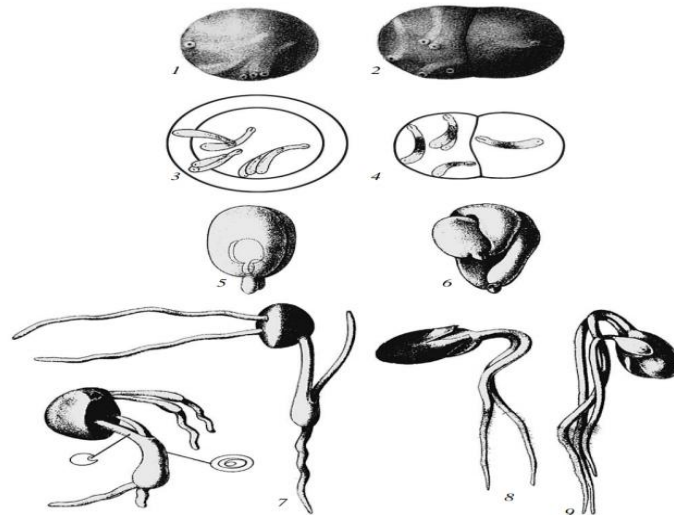


Fig.10: Polyembryonie et germination des graines polyembryoniques. (1) Aspect extérieur d'une graine. On peut voir sept embryons ;(2, 3) position des embryons dans la graine ; (4) deux graines provenant du même fruit ; (5) trois embryons dans la même graine, deux d'entre eux, plus petits, se trouvent entre les cotylédons du gros embryon (leurs tailles et positions sont indiquées par des lignes pointillées) ; (6) deux embryons dans la même graine, un petit embryon se trouve entre les cotylédons inégaux du plus grand; (7-9) graine en train de germer. (D'après Braun, 1859).

II.4 Variation génétique de la Polyembryonie:

La diploïdie est la règle générale chez les citrus et les genres apparentés d'Aurantioidae avec un nombre de chromosomes de base $x = 9$, soit $2n = 2x = 18$ (Krug 1943). Cependant, certains génotypes euploïdes ont été trouvés dans le germoplasme des agrumes. Les variations euploïdes les plus courantes sont les triploïdes et les tétraploïdes. (Gmitter, FG&,al (2012).

Les espèces d'agrumes ont de petits génomes. La taille du génome haploïde de *Citrus sinensis* est estimée à 372 Mb. Les travaux ont estimé la taille du génome des agrumes par cytométrie en flux pour au moins quatre génotypes par espèce. Les génomes les plus gros et les plus petits étaient respectivement *Citrus medica* (le cédrat, avec une valeur moyenne de 398 Mb/génome haploïde) et *Citrus reticulata* Blanco (le mandarine, avec une valeur moyenne de 360 Mb/génome haploïde). *Citrus maxima* (Burm.) Merrill, le pomelo, était intermédiaire avec une moyenne de 383 Mb/génome haploïde. Fait intéressant, les espèces secondaires présentaient des valeurs intermédiaires entre leurs taxons parentaux ancestraux

putatifs: 370, 368, 381 et 380 Mb pour *C. sinensis* (L.), *Citrus aurantium* (L.), *Citrus paradisi* Macf. Et *Citrus limon* (L.) Burm/ génomes haploïdes, respectivement.

II.5 Amélioration des agrumes:

L'accroissement des pressions phytosanitaires et la diversification variétale effectuée sur des critères de qualité attendue par le marché sont les deux justifications majeures des programmes d'amélioration des agrumes à travers le monde. Ces derniers, se sont longtemps heurtés aux contraintes spécifiques du système de reproduction des agrumes. (Ollitrault, P., & Luro, F. (1995)).

Le développement des techniques de marquage moléculaire et de biologie cellulaire, en particulier celles associées à l'embryogenèse somatique, ouvre aujourd'hui des perspectives très prometteuses pour apporter une solution variétale aux grands enjeux de l'agrumiculture.

L'apport des biotechnologies dans le domaine de l'amélioration des agrumes, referme les contraintes associées à l'amélioration conventionnelle, est présente sur la base d'une synthèse bibliographique (Ollitrault et Luro, (1995).

II.5.1 Objectifs d'amélioration et dispersion des gènes d'intérêt agronomique:

II.5.2 Objectifs de l'amélioration des porte-greffes:

Le génotype des porte-greffes permet de moduler le comportement de l'association porte-greffe/cultivar pour de nombreux caractères:

a- La sélection de porte-greffe conférant à l'association, une résistance ou une tolérance à la Tristeza, est une priorité pour toutes les zones de culture. En effet, cette maladie à virus a sans doute été la plus dommageable pour les plantations d'agrumes depuis les années 1950. (AUBERT, 1989)

b-La résistance au froid de l'association constitue un objectif particulièrement important pour la Floride, le Japon ou la Géorgie, et peut être fortement améliorée par le porte-greffes.

c-La vigueur de la partie aérienne et la productivité sont également affectées par le porte-greffe. (BLONDEL, 1974).

Ainsi, dans certaines régions, les sélectionneurs recherchent des porte-greffes nanisant afin de réaliser des plantations à haute densité. En revanche, dans le Nord du Bassin méditerranéen, la sélection de porte-greffes vigoureux est encore une priorité.

Enfin, au-delà d'un effet quantitatif sur la récolte, le porte-greffe à une influence non négligeable sur le plan qualitatif. Il agit sur de nombreux facteurs importants sur le plan économique, comme le calibre, l'épaisseur de la peau, la teneur en jus ou la saveur du fruit. Des effets sont également pris en compte lors de la sélection en fonction des qualités intrinsèques des cultivars qui lui sont associés (Serra, 1992).

II.6 Tolérance et résistance aux maladies et parasites:

La principale source de résistance aux *Phytophthora sp* et aux nématodes est le *Poncirus*. Des résistances ont également été trouvées chez *Citrus grandis* et *C. aurantifolia*. Pour la Tristeza, importance maladie virale, la meilleure source de résistance trouvée est également le *Poncirus*. *Murayapaniculata* serait tolérant au greening (maladie bactérienne), de même que des résistances aux acariens phytophages ont été trouvées chez les mandariniers et le pomelo Marsh (SOOST et CAMERON, 1985).

II.7 Polyembryonie:

Chez de nombreux cultivars, les graines contiennent plusieurs embryons; les embryons surnuméraires sont issus des cellules du nucelle. Seules deux espèces (*C.medica et C. grandis*) ne présentent que des cultivars monoembryonés. Pour les autres, le degré de polyembryonie peut varier de manière importante suivant les variétés.

La polyembryonie conduit à l'obtention des plants de semis d'origine nucellaire possédant le génotype maternel. Elle limite ainsi les effectifs des populations recombinantes, et donne la probabilité d'obtenir des génotypes élites par hybridation entre cultivars polyembryonies.

Cette contrainte a réduit significativement la base génétique exploitée en conduisant les améliorateurs à ne retenir généralement que des génotypes femelles monoembryonnés (Soost, 1987).

II.7.1 Discrimination entre plants hybrides et nucellaires:

Du point de vue morphologique, les plants nucellaires présentent, comme les plants zygotiques, des caractères de juvénilité marqués (présence d'épines, 1ère induction florale tardive) et sont souvent plus vigoureux que les zygotes issus d'autofécondation.

De nombreuses techniques biochimiques ont été expérimentées pour distinguer précocement les plants zygotiques et nucellaires: chromatographie en phase gazeuse (Soost 1965); ou chromatographie sur couche mince (Yamamoto, et *al*, 1995). L'électrophorèse d'isozymes s'est avérée performante pour les analyses de routine (Khan et Kender 2007).

Aujourd'hui, l'utilisation de marqueurs moléculaires de type RFLP, RAPD, SSR permet de distinguer facilement les plants zygotiques, des nucellaires. Les marqueurs les plus performants sont les marqueurs co-dominants présentant du polymorphisme entre les parents.

L'utilisation de cinq marqueurs co-dominants polymorphes permet d'atteindre une probabilité de 96,9% d'identification de zygotiques dans une situation d'autofécondation (Luro, 1993).

II.8 Apport des biotechnologies:

Les récents développements des outils de biologie cellulaire et moléculaire permettent d'une part d'envisager une efficacité accrue des programmes de création

Variétaletotalement nouvelle (Tab.2) (Ollitrault et Luro (1995).

Tableau01: Applications des outils de la biologie cellulaire et moléculaire aux différentes stratégies d'amélioration d'agrumes. (DURHAM et al, 1992).

	Marqueurs moléculaires	Cytometrie en flux	Sauvetage d'embryon	Haplo-méthodes	Embryogénèses omatique	Protoplasts
Gestion du germoplasme	+	+				
Hybrides sexués	+		+	+		
Hybrides somatiques	+	+			+	+
Cultivars triploïdes	+	+	+	+	+	+
Plantes transgéniques	+				+	+

II.9 Systèmes de régénération in vitro:

Les agrumes sont généralement multipliés de manière asexuée par greffage de scions sur des plants nucellaires utilisés comme porte-greffes ou par bouturage. La plupart des espèces de ce genre sont caractérisées par un haut degré de polyembryonie, consistant à la production, dans une seule graine, de 1-40 embryons adventifs par le nucelle, de sorte que deux embryons ou plus se développent. Les nucellaires sont semblables à la plante mère, tandis que les embryons zygotiques ont tendance à être faibles et variables, et très souvent ne survivent pas car ils sont en compétition avec les embryons nucellaires pour les nutriments et l'espace. En raison de la polyembryonie, la germination des graines à pollinisation ouverte est une procédure couramment utilisée chez les agrumes pour la propagation à grande échelle des porte-greffes en pépinière. (Wutscher, 1979).

La culture tissulaire, l'un des domaines les plus intéressants de la biotechnologie végétale, consiste en la capacité d'établir et de maintenir des tissus végétaux (cals, cellules, etc.); de tissus végétaux (cals, cellules, protoplastes, etc.), et d'organes végétaux (embryons, pousses, racines, parties florales) dans un milieu de croissance nutritif in vitro. Des organes

végétaux (embryons, pousses, racines, parties florales) dans un milieu de croissance nutritif, dans des conditions aseptiques et dans des conditions environnementales contrôlées.

La micropropagation est une alternative précieuse à la propagation traditionnelle, en particulier lorsque la régénération des pousses est obtenue par organogénèse directe *in vitro*. Dans le but d'augmenter le nombre et la qualité des cultivars et des porte-greffes disponibles pour les cultivateurs, elle fournit de nombreux avantages pratiques à l'activité de pépinière, tels que l'accélération et l'amélioration de la multiplication végétative et de la production de plants conformes et exempts de virus.(Barlass and Skene, 1982)).

Il y a beaucoup d'autres avantages pour lesquels cette technique est très importante, comme lorsque les cultivars sont monoembryonnaires, sans graines, ou produisant peu de graines, ou lorsque de nouvelles introductions sont faites.(Cervera et *al.*, 2008)).

Chez les agrumes, des taux de multiplication plus élevés sont obtenues en utilisant des explants juvéniles, mais les plantes régénérées à partir de ces tissus présentent généralement de fortes caractéristiques juvéniles indésirables et sont lentes à porter.

Avant tout, pour introduite une variation génétique par transformation génétique ou mutagénèse, il est fondamental de disposer de protocoles efficaces à partir de tissus adultes. Seuls quelques protocoles de micropropagation de plantes adultes d'agrumes ont été développés en raison du niveau élevé de contamination, du faible potentiel morphogénétique et de la faible capacité d'enracinement des pousses régénérées. Par exemple, des pousses ont été régénérées par Altman et Goren (1974) à partir de bourgeons latéraux prélevés sur un plant mature d'orange douce, et des plantules ont été régénérées par Barlass et Skene (1982) à partir de segments nodaux de plants matures de mandarine Cleopatra, de citrangeCarrizo, de Rangpur, d'orangerie et d'agrumes. Tandis que Kotsias et Roussos (2001) ont utilisé des segments nodaux de plantules de citron pour étudier l'effet de différents régulateurs de croissance des plantes. De plus, l'influence du milieu de base et de différents régulateurs de croissance des plantes sur la micropropagation a été étudiée. (PérezTornero et *al.* (2010).

La régénération *in vitro* a été obtenue à partir de plusieurs types d'agrumes grâce à différentes techniques et voies de régénération *in vitro*, telles que l'embryon somatique et l'organogénèse. Une morphogénèse directe (sans production de cal) ou indirecte a été observée dans différents tissus d'agrumes. En particulier, la régénération *in vitro* a été décrite

chez plusieurs espèces de citrus en utilisant comme explants des segments intermodaux, des segments d'épicotyles (**Fig.11**), des segments d'hypocotyles avec des fragments de cotylédons attachés ou non, et des organes reproducteurs.

Plusieurs études ont montré que de nombreux facteurs affectent la réponse à la culture *in vitro*: le génotype ; le type d'explant, l'âge, la coupe et l'orientation des explants ; l'âge et les conditions physiologiques des donneurs d'explants. Les compositions du milieu de culture et les conditions d'incubation.(Casaleset *al.* 2015)

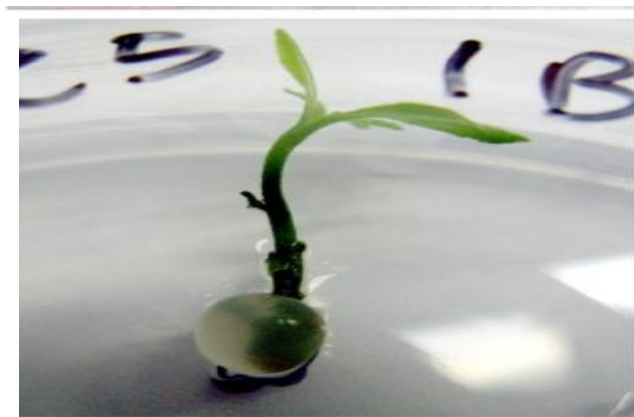
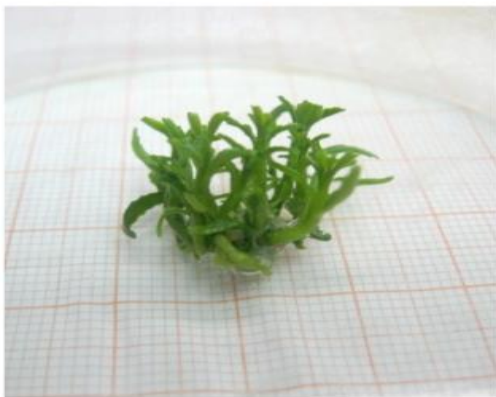


Fig.11: Pousses adventives produites par des segments épicotyles de citrange Carrizo (*Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata*) cultivés en position (A) et repousse de microcoupe encapsulée de citrange Carrizo (B). (Almeida et *al.*,2003)

II.9.1 Marquage moléculaire:

Les marqueurs moléculaires se divisent en trois grandes classes:

- 1- Les métabolites secondaires (polyphénols, aromes, huiles essentielles) analysés par chromatographie ou résonance magnétique nucléaire.
- 2- Les protéines (protéines totales ou isozymes) étudiées par électrophorèse.
- 3- l'ADN lui-même analysé par le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) ou via les techniques d'amplification par PCR. Les métabolites secondaires ont été étudiés principalement à des fins taxonomiques et pour la discrimination des plantes zygotiques et nucellaires (**Fig.12**)

Les isozymes ont été les premiers marqueurs génétiques étudiés chez les agrumes; une quinzaine de systèmes sont analysables en routine à partir de feuilles ou d'écorces et apportent des informations sur le polymorphisme d'une vingtaine de locus. Plus récemment des techniques ont été développées; elles augmentent considérablement la puissance du marquage génétique chez les agrumes (Ollitrault et Luro, 1995).

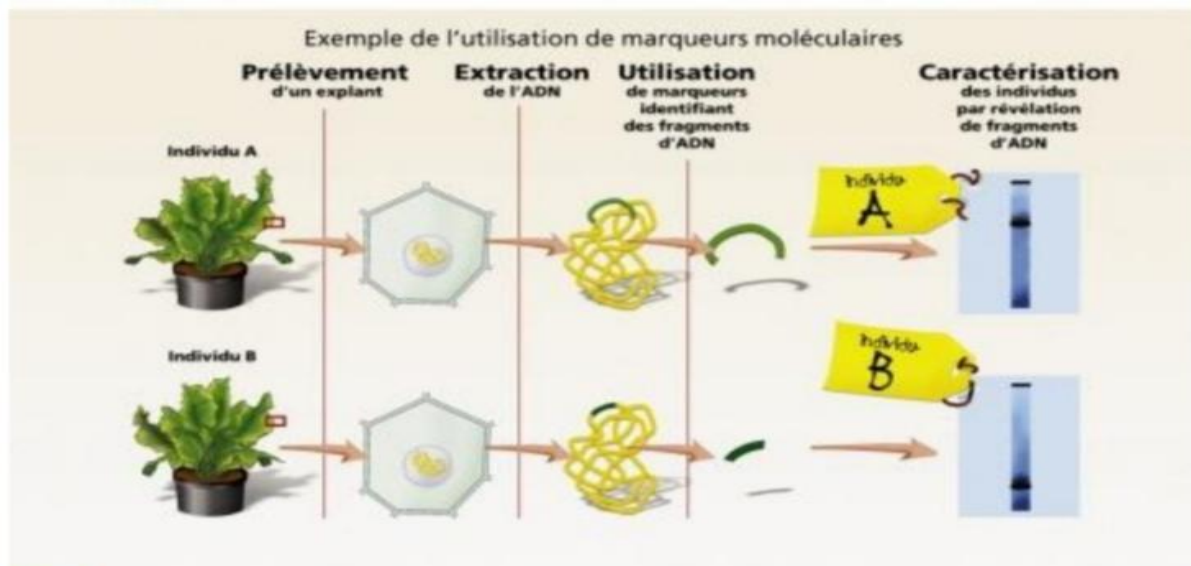


Fig.12: Exemple d'utilisation de marquage moléculaire.

II.9.2 Microgreffage d'apex et assainissement du germoplasme:

L'assainissement du matériel végétal est une composante importante de la gestion du germoplasme agrumes. Celui-ci a longtemps été réalisé par sélection de plantes d'origine unicellulaire. Par ailleurs, le passage par l'embryon est associé à des caractères de juvénilité défavorables.

La culture de méristème d'agrumes s'étant avérée peu efficace, l'assainissement est aujourd'hui classiquement réalisé par thérapie associée au microgreffage d'apex sur de jeunes porte-greffes *in vitro* (NAVARRO, 1982 ; Vogel *al*, 1988).

II.9.3 Sauvetage d'embryons:

La culture *in-vitro* d'embryons de pépins a divers stades de développement à deux applications principales. La première est l'obtention de plantules hybrides dans des croisements entre variétés polyembryonies. La seconde est le sauvetage d'embryons polyploïdes.

Il est possible de sauver des embryons à des stades de développement précoce comme le stade cordiforme ou globulaire. Ils ont ainsi obtenu des plantules hybrides issues de croisements entre variétés polyembryonies. La culture d'ovules fécondés de cultivars polyembryonies prélevés trois semaines après anthèse a également permis d'obtenir des plantules hybrides (RANGAN *et al*, 1969).

II.9.4 Embryogénèse somatique:

L'embryogénèse somatique des génotypes polyembryonies du genre citrus est maîtrisée depuis le début des années 1970. La culture *in vitro* d'ovules, fécondés ou non, permet d'amplifier le phénomène naturel d'apomixie, soit directement, soit après passage par cal. Il semble ainsi avoir un lien direct entre le degré de polyembryonie *in-vivo* d'un génotype et ses capacités embryogénèse *in-vitro* (KOBAYASHI, 1987).

II.9.4.1 Étapes de l'embryogénèse somatique: L'embryogénèse somatique implique une série de transformations commençant par:

(A) des cellules somatiques différenciées et vacuolées de cals, qui deviennent.

(B) des cellules indifférenciées embryogènes, chacune se développant en (C) un proembryon, puis (D) un embryon au stade globulaire, (E) au stade cordiforme, au stade torpille, pour finalement donner (G) une plantule à deux semaines et (H) à quatre semaines. (I) Les plantules sont ensuite transplantées en terreau et acclimatées en serre (Fig.13).(Antoine CA&, al (2019))

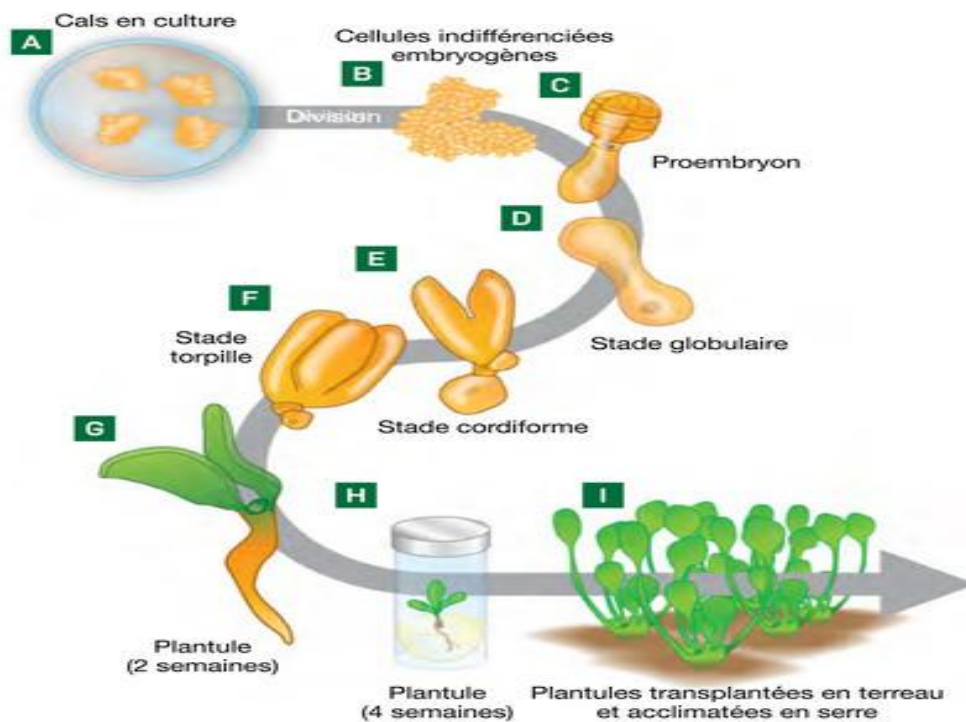


Fig.13:Etapes de l'embryogenèse somatique.(Antoine Ca &,al(2019))

II.9.5 Transformation génétique:

Les recherches sur la transformation génétique sont relativement récentes. Elles exploitent le système de régénération par embryogenèse somatique, ils ont réalisé des transferts directs sur protoplastes. Ils ont régénéré des plants résistants à la Kanamycine et à l'hygromycine après transformation par culture de cals embryogènes d'Agrobacterium, ils développent le transfert direct par canon à particules sur des cals embryogènes.

Un des rares exemples de transfert de gènes potentiellement utile est celui du gène de la protéine capsidique du virus de la tristeza.

La transformation génétique apparaît comme une stratégie privilégiée pour améliorer des espèces comme les orangées, les pomelos ou les citronniers, compte tenu de leurs structures génétiques.

La combinaison de cette technique avec la localisation et l'isolement des gènes majeurs de résistances, présents dans le germoplasme, devrait atteindre considérablement les domaines d'applications (MOORE et *al* (1992).

II.9.5.1 Transformation de protoplastes: Les protoplastes sont des cellules végétales dont les parois cellulaires ont été retirées mécaniquement ou enzymatiquement. Les enzymes fongiques telles que la cellulase, le macérozyme et la pectinase sont utilisées pour la digestion des parois cellulaires. Les protoplastes sont des cellules totipotentes et peuvent se régénérer en plantes fertiles dans des conditions optimales de culture de tissu de culture tissulaire (**Fig.14**). L'intégration d'ADN dans les protoplastes peut être stimulée soit par un traitement au polyéthylène glycol (PEG) qui favorise l'agglutination des protoplastes et induit l'intégration de l'ADN par endocytose, soit par électroporation qui déclenche la déstabilisation de la membrane plasmique et l'absorption ultérieure de l'ADN. (Davey & *al.*, 1989).

Chez les agrumes, des cultures de cellules embryonnaires en suspension ont été utilisées pour obtenir des protoplastes totipotents. La méthode de transformation des protoplastes médiée par le PEG est la plus courante et la mieux établie pour la transformation des protoplastes des agrumes.

Auparavant, les protocoles de transformation de protoplastes médiés par PEG utilisaient des gènes de résistance aux antibiotiques pour l'identification des cellules transformées. Le marqueur basé sur l'EGFP a ensuite été utilisé pour sélectionner les plantes transgéniques transformées avec le gène de tolérance au chancre putatif Xa21 ou un gène de qualité du fruit.

L'utilisation de l'électroporation dans la transformation génétique des agrumes a été limitée à quelques études avec des succès variés. Les chercheurs ont utilisé cette technique pour la transformation de la mandarine. L'utilisation de l'électroporation a également été rapportée pour la transformation en protoplastes de l'orange douce Hamlin en utilisant une

construction plasmidique encodant une EGFP ciblée sur le réticulum endoplasmique qui a donné lieu à une expression plus stables. (Omar& Grosser, 2008).

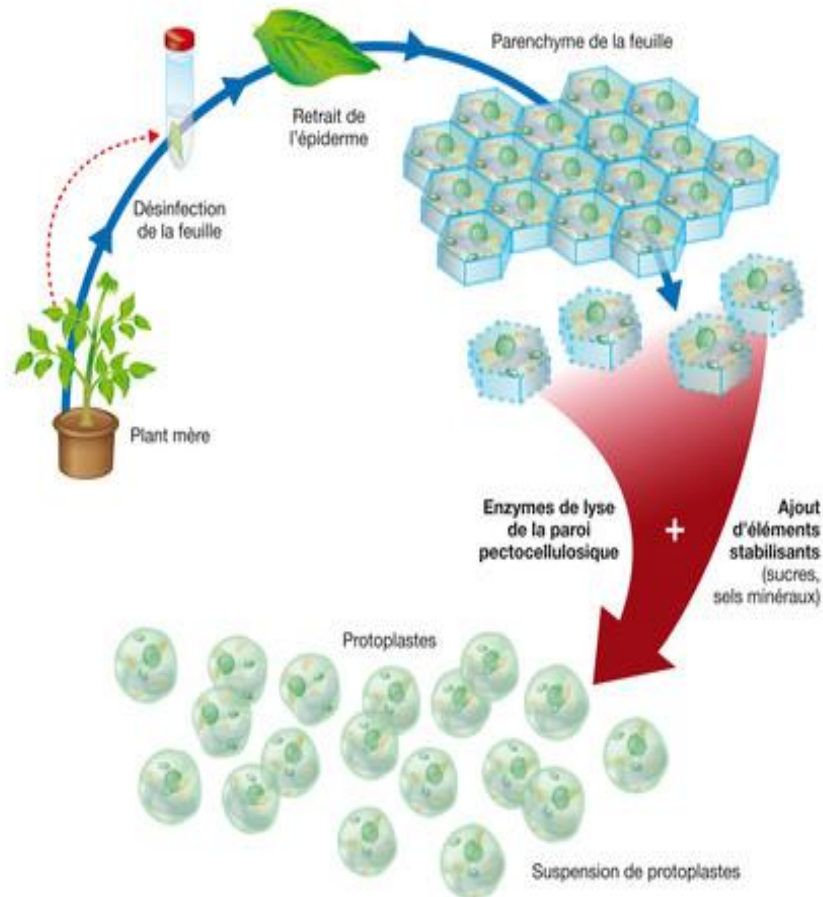


Fig.14:Obtention de protoplastes par digestion enzymatique.(Antoine Ca &,al(2019)

II.9.5.2 Transformation des agrumes à l'aide d'Agrobacterium:Cette méthode de transformation des agrumes a gagné en popularité en raison des efficacités de transformation plus élevées obtenues chez la plupart des cultivars lorsqu'on utilise Agrobacterium (**Fig.15**); cultivars en utilisant Agrobacterium. Le premier rapport sur la transformation des agrumes par Agrobacterium a été publié pour la transformation de cellules embryogénèse en suspension de Washington navel, Trovitasweet orange, en utilisant deux souches de A. tumefaciens contenant la néomycine phosphotransférase (nptII) et l'hygrométrie; (nptII) et hygromycinephosphotransférase (hptII) comme marqueurs de sélection antibiotique.

(Ballester & *al.*, 2007). La transformation médiée par *Agrobacterium* a ensuite été utilisée pour la transformation de la citrange Carrizo et de l'orange trifoliée, en utilisant des segments de tige intermodaux et épicotyles comme explants, respectivement.

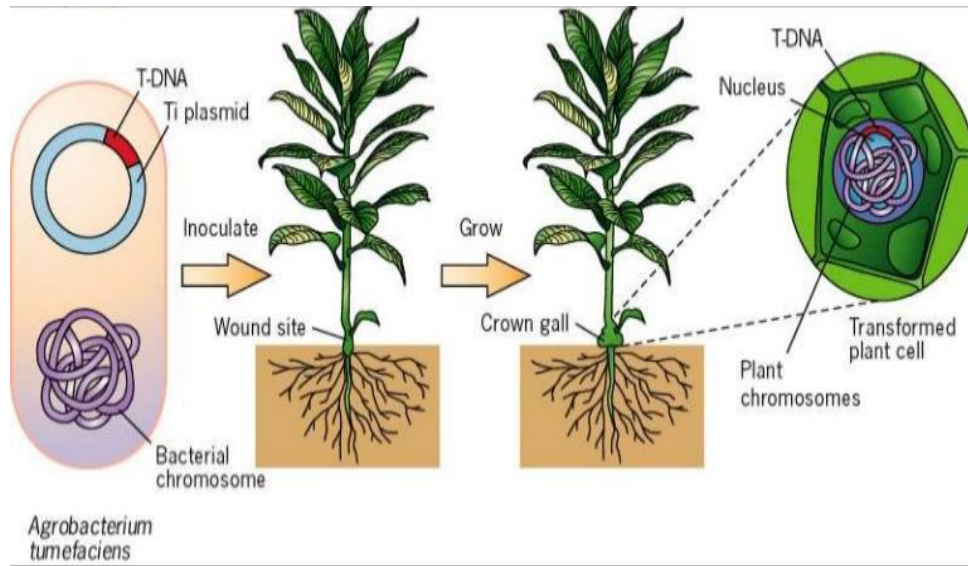


Fig.15 : Transformation de plante par *Agrobacterium*.(Maker 2017).

II.10 La création et la sélection de variétés chez les agrumes:

La sélection humaine s'est manifestée, dans un premier temps, il y a plusieurs millénaires, sur la domestication des agrumes d'intérêt, et par la suite sur le maintien et la multiplication des variantes. Ce n'est qu'à partir du début du XIX^{ème} siècle que l'homme a réellement essayé d'orienter la création d'hybrides en contrôlant la pollinisation.

Les projets d'amélioration variétale formulent plusieurs objectifs selon l'espèce, il s'agit d'élargir la saison de maturation (cultivars à maturation précoce ou tardive), la production de fruits sans pépins et faciles à éplucher (pour les mandariniers), la résistance au froid, une meilleure standardisation des fruits (forme et taille) et de la composition chimique du fruit, une maîtrise du comportement post-récolte et la résistance à la plupart des maladies et des ravageurs nuisibles.(Navarro,& *al* ,2012)

Les améliorateurs d'agrumes, tirant profit de la propagation végétative, mettent tout leur effort dans l'induction du polymorphisme dans un seul cycle à partir duquel ils font de la sélection clonale.

La sélection concerne donc ou bien les mutations spontanées identifiées en verger, ou les génotypes obtenus par hybridation, la mutagenèse induite, ou encore après avoir eu recours aux différentes approches biotechnologiques (hybridation somatique, transformation) (Ollitrault et Navarro, 2012).

Conclusion générale

Conclusion:

La polyembryonie conduit à l'obtention des plants de semis d'origine nucellaire possédant le génotype maternel. Les avancées spectaculaires des techniques de multiplication végétative, surtout en matière de diffusion rapide des progrès de la sélection, ouvrent de nouvelles perspectives en termes de valorisation et de conservation des ressources génétiques des espèces d'agrumes.

Les techniques in vitro et particulier celles liées à l'embryonie nucellaire sont très prometteuses, pour une obtention des plants porte-greffes pratiques, généralisée dans les systèmes modernes de production d'agrumes, qui assure l'uniformité de l'arbre, une production rapide, et une tolérance aux pathogènes comme les *Phytophthora* sp., les nématodes parasites et les viroses.

Le développement des biotechnologies permet toutefois d'être plus optimistes pour les années à venir. Le marquage moléculaire a, en effet, permis d'éclaircir l'organisation génétique des agrumes, de distinguer les embryons somatiques et zygotiques, et pourrait, dans un proche avenir, autoriser la sélection précoce de certains caractères d'intérêt agronomique, dans les descendance de croisements.

Références bibliographiques

Références bibliographique:

Agostini, (1995). Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. *Phytopathology* 83:485-490.**pp04.**

Antoine Ca&, al(2019).les étapes de l'embryogense somatiques.

AUBERT.B. (1989) .Preventing Citrus debilitating diseases for profitable crops in Sout h East Asia .UNDP FAO Doc.**18p.**

Ballester, A., Cervera, M., Peña, L., (2007). Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transférase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination. *Plant Cell Rep.* 26 (1), **39–4.**

Barlass, M., Skene, K.G.M., (1982). In vitro plantlet formation from citrus species and hybrids. *Sci. Hortic.* 17 (4), **333–341.**

Batygina, TB et Vinogradova, GY (2007). Phénomène de polyembryonie. Hétérogénéité génétique des graines. *Journal russe de biologie du développement* , 38 (3), 126 .**pp29**

Batygina, TB et Vinogradova, GY (2007). Phénomène de polyembryonie. Hétérogénéité génétique des graines. *Journal russe de biologie du développement*, 38 (3), 126-151.**RUSSIAN JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY Vol. 38 No.pp127**

Bounab.D & Chaabi.Y(2018).Etude de la variabilité morphologique au sein d'une collection d'agrumes cultivée à l'Est Algérien, W. Skikda. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.**pp14_15, 16, 17,20_23.**

BLONDEL .L . (1974) b .Influence des porte-greffes sur la qualité des fruits de Citrus .*Fruits*, 29 (4), **285-290.**

Bot. G.(1943),. La Polyembryonie chez les Citrus. Son intérêt dans la culture et l'amélioration. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 27(301), 483-495.[https://www.persee.fr/doc/jatba_0370-5412_1947_pp_27_301_6126.](https://www.persee.fr/doc/jatba_0370-5412_1947_pp_27_301_6126)

Cameron JW, Soost RK (1969). Characters of new populations of citrus polyploïdes and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraplo" id progeny. In: *Proc 151 Int Citrus Symp*, 1 968, Riverside, USA, Univ California, Chapman Ed, 1, **1,99.205.**

Casales, F.G., Chiancone, B., Germanà, M.A., Micheli, M. (Eds.), (2015). Study on conversion of encapsulated vitro-derived propagules of c35 citrange [*C. sinensis* (L.)Osb. × *P. trifoliata* (L.) Raf.]. *International Society for Horticultural Science (ISHS)*, Leuven, Belgium.

Cervera, M., Navarro, A., Navarro, L., Peña, L., (2008).Production of transgenic adult plants from Clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. *Tree Physiol.* 28 (1), **55–66.**

Références bibliographiques

- Curk F., Ancillo G., Ollitrault F. et al. (2015)**, Nuclear Species-Diagnostic SNP Markers Mined from 454 Amplicon Sequencing Reveal Admixture Genomic Structure of Modern Citrus Varieties. *PloS One*, **10**, **5**, **25 p.**
- Davey, M.R., Rech, E.L., Mulligan, B.J., (1989)**.Direct DNA transfer to plant cells. *Plant Mol. Biol.* **13** (3), **273–285**.
- Durham RE, Liou PC, Gmitter RG, Moore GA (1992)**. Linkage map of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in citrus. *Theor Appl Genet* **84**, **39-48**.
- Gmitter, FG, Chen, C., Machado, MA, De Souza, AA, Ollitrault, P., Froehlicher, Y., & Shimizu, T. (2012)**. Génomique des agrumes. *Tree Genetics & Genomes*, **8** (3), **611-626**.
- Herrero R., Asins M.J., Pina J.A., Carbonell E.A. and Navarro L., (1996) b**. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theoretical and Applied Genetics*. **93**: **1327-1334**.
- Jacquemond &, al. (2013)**. Connaître l'arbre et son fonctionnement. In: Les clémentiniers et autres petits agrumes. Jacquemond C., Curk F., Marion H. eds, Versailles, France, **pp. 165-182**.
- Khan et Kender (2007)**, L'électrophorèse d'isozymes.
- Khefifi, H. 2015**. Etudes physiologiques et génétiques de caractères morpho-physico-chimiques des fruits d'agrumes au cours de la maturation jusqu'à l'abscission. *montpellier.france*.pp13, **18,32**.
- Kobayashi S (1987)**.Uniformity of plants regenerated from orange (*Citrus sinensis* Osb) protoplasts. *Theor Appl Genet* **7** **4**, **10-14**.
- Ladanyia M. (2008)**. Citrus fruit: biology, technology and evaluation. Academic press, **542 p.**
- Leroy, J. F. (1947)**. La Polyembryonie chez les Citrus. Son intérêt dans la culture et l'amélioration. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, **27**(301), **483-495**.
- Luro F, Lorieux M, Laigret F, Bove JM, Ollitrault P (1995)**.Genetic mapping of an intergeneric citrus hybrid using molecular markers. *Fruits* **49** (5-6), **404-408**.
- Luro F, Curk F. (2013)**. La clémentine dans la diversité génétique des agrumes. In: Les clémentiniers et autres petits agrumes. Jacquemond C., Curk F, Heuzet M. eds., Versailles, France, **pp,17-36**.
- Loussert.R, (1985)**.les agrumes.Paris, France, J.B.Bailliere.**136pp**.
- Mabberley D. J. (1997)**, A classification for edible Citrus (Rutaceae).*Telopea*.**p167- 172**.
- Mourad.K,(2011)**,Biologie de la reproduction des hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes implication sur la structure génétique des populations d'hybrides générées dans les

Références bibliographiques

croisements diploïdes x tétraploïdes ,UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI (fig01).pp01.

Mourad.K,(2011),Biologie de la reproduction des hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes ; implication sur la structure génétique des populations d'hybrides générées dans les croisements diploïdes x tétraploïdes, UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI (fig02).pp13.

Navarro L (1982).Citrus shoot-tip grafting in vitro (STG) and its applications :à review. In: Proc Int Sac Citriculture, Novembre 9-1 2, 1 981 , Tokyo, Japan. Okitsu, Japan, In! Soc Citriculture, 1, **452-456**.

Ollitrault P., Jacquemond C., Dubois C., Luro F., (1999).Citrus. In: Genetic diversity of cultivated tropical plants. Edited by Hamon P., Seguin M., Perrier X., Glaszmann J.C. Enfield, Science Publishers. Montpellier, pp. 89-111.

Ollitrault (P.), OLLITRAULT (Frédérique) et CABASSON (Cécile).(1995) .Induction de cals embryogènes d'agrumes par culture d ' ovules .Détermination isoenzymatique de l ' origine tissulaire des embryons.Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p .204-212 .

Omar, A.A., Grosser, J.W., 2008. Comparison of endoplasmic reticulum targeted and nontargeted cytoplasmic GFP as a selectable marker in citrus proto-

Plast transformation. Plant Sci. 174 (2), **131–139**.

Penjor T., Yamamoto M., Uehara M., et al. (2013), Phylogenetic relationships of Citrus and its relatives based on matK gene sequences. PloS one, 8, 4, pp. 62574.

Pérez-Tornero, O., Tallón, C.I., Porras, I., 2010. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. Plant Cell Tissue Organ Cult. 100 (3), 263–271

Rangan TS, Murashige T, Bitters WP (1969) In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. In: Proc 151 In/ Citrus Symp, 1 968, Riverside, Etats-Unis, Univ California, Chapman, ed, 1, **225-229**.

Rocha-Pena.M et Richard.F et Niblett.S.L et Francisco M.,(1995).Citrus Tristeza Virus and Its Aphid Vector Toxoptera citmicida.university of florida,citrus research and Education center. 79(5):43.

Salunkhe D. K., Kadam S. (1995). Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage, and processing. CRC Press, **632 p**.

Salunkhe et Kadam,(1995) ; Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996. Biology of citrus / Pinhas Spiegel-Roy, Eliezer E. Goldschmidt., Spiegel-Roy, Pinchas. Cambridge; 1996. New York Cambridge University Press.

Références bibliographiques

Serra, D. D. R. (1992).L'amélioration des agrumes: II-Créations variétales et biotechnologies. Fruits, 47(spec), 124-134.

Soost RK (1987).Characters of new populations of citrus polyploids and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny

Swingle, J. P. Torres, Sokol'skaja, H. P. Traub(1942).

Toenniessen,(2001).L'amélioration des agrumes.

Vogel R, Bove JM, Nicoli M (1988), Le programme français de sélection sanitaire des agrumes. Fruits Webber H.J., 1967. History 43 (1 2), **709-720**

Webber H.J., 1967. History and development of the citrus industry. In: The citrus industry. 1. Reuther W. et al. (eds.), Berkeley, Etats-Unis, University of California Press, **pp. 1-39**
Froelicher, et al. 2000.

W. T. Swingle (1927).La Polyembryonie chez les Citrus. Son intérêt dans la culture et l'amélioration. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée .Wutscher, H.K., 1979. Citrus rootstocks. Hortic. Rev. 1, **237.269.**

Yamamoto M, Kobayashi S, Nakamura Y, Yamada Y(1995).Phylogenetic relations of citrus revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. Jpn J Breed 43, 355-365.

Yssad, H& Medaouar,Z.(2018).Caractérisation morphologique de colletotrichum gleosporioides et colletotrichum sp. , responsables de l'antracnose des agrumes à Mostaganem et spécialisation parasitaire du pathogène.Université Abdelhamid Ibn Badis-MostaganemFaculté des Sciences de la Nature et de la Vie**02.**

Yssad,H&Medaouar,Z.(2018).Caractérisation morphologique de colletotrichum gleosporioides et colletotrichum sp., responsables de l'antracnose des agrumes à Mostaganem et spécialisation parasitaire du pathogène. Université Abdelhamid Ibn Badis-MostaganemFaculté des Sciences de la Nature et de la Vie pp04, 07,24_25.