

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة، الحراش، الجزائر  
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (E.N.S.A.), El-Harrach, Alger



## Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT** en Sciences  
Agronomiques

## Thème

**Assainissement et Régénération des Plants d'Agrumes par  
l'Embryogenèse Somatique à partir de la culture de  
Stigate et Style**

Présentée par M<sup>elle</sup> Meziane Malika

### Devant le jury :

Président	: M <sup>r</sup> BOUZNEZ Z.	Professeur ENSA - El Harrach (Alger)
Directeur de thèse	: M <sup>r</sup> BOUDJENIBA M.	Professeur ENS-Kouba (Alger)
Co-Directeur de thèse	: M <sup>me</sup> D'Onghia A.M.	Responsable du secteur IPM. IAM de Bari. Italie
Examinatrice	: M <sup>elle</sup> BOUREGHDA H.	Maitre de conférences « A » ENSA -El Harrach Alger)
Examineur	: M <sup>r</sup> SAADI A.	Professeur UHB-Chlef
Examineur	: M <sup>r</sup> SETTI B.	Maitre de conférences « A » UHB-Chlef

Année : 2012/2013

## ***Sanitation and Regeneration of Citrus Plants by Somatic Embryogenesis from Stigma and Style culture***

### ***Abstract***

somatic embryogenesis (SE) from Stigma and style *in vitro* culture is one of the efficient methods in plant regeneration of most Citrus spp., without inducing somaclonal variations in regenerants; it proved to be effective in the elimination of the main citrus virus and virus-like diseases. This technique was applied on 35 genotypes of different Algerian citrus species (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *C. limon* (L.) Burm., *C. reticulata* Blanco, *C. paradisi* Macfad, *C. reshni* Hort. ex Tan., *C. jambhiri* Lush, *C. maxima* (Burm.) Merrill.), present in the national citrus germplasm collection Algeria. These genotypes, used as flowers sources, were tested by serological, molecular and biological assays for assessing the presence of the main virus and virus-like agents. All the genotypes showed to be infected by one or more graft transmissible agents (viroids, virus). Pistils were cultured *in vitro* for the regeneration of somatic embryos. Callus was formed at the cut end of the styles in all tested genotypes. Embryogenesis occurred 38 to 150 days after culture initiation. *in vivo* acclimatization of regenerated plantlets was performed by grafting onto *in vivo* seedlings. After sanitary assays, no virus, viroid and virus-like infection present in the mother plants, was assessed in plants regenerated through SE. In order to verify the genetic stability of the regenerants plants, fifteen regenerants were randomly selected from different genotypes and evaluated for somaclonal variation using inter-simple sequence repeat ISSR analyses.

**Keywords :** Citrus, regeneration, sanitation, somatic embryogenesis, stigma, style, somaclonal variability

## ***Assainissement et Régénération des Plantes d'Agrumes par l'Embryogenèse Somatique à partir de la culture de Stigmate et Style***

### ***Résumé***

L'embryogenèse somatique issue de la culture *in vitro* de style et stigmate est l'une des méthodes les plus efficaces dans la régénération de la plupart des espèces d'agrumes du genre *Citrus*, sans l'induction de la variation somaclonale. En outre, elle s'avère très efficace dans l'élimination des plus importantes maladies virales et de types virales affectant les agrumes. Cette technique a été appliquée sur 35 génotypes de différentes espèces de la collection nationale des agrumes, ([*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *C. limon* (L.) Burm, *C. reticulata* Blanco, *C. paradisi* Macfad, *C. reshni* Hort. ex Tan., *C. jambhiri* Lush et *C. maxima* (Burm.) Merrill]). Les génotypes sources de fleurs, ont été testés pour la présence des principaux

virus et virus similaires par l'utilisation de techniques biologiques, sérologiques et moléculaires. La plupart des génotypes ont été infectés principalement par des virus et viroïdes. Des pistils ont été mis en culture *in vitro* pour l'obtention d'embryons somatiques. Les cals se sont formés à la base du style. L'embryogénèse survient 38 à 150 jours après la culture initiale. L'Acclimatation *in vivo* des plantules régénérées a été réalisée par un greffage sur porte greffe. Après l'évaluation de l'état sanitaire, aucun virus, viroïde et virus similaires présents dans les plants mère n'a été détecté dans les plants régénérés par l'embryogénèse somatique. Afin de vérifier la stabilité génétique des plantes régénérées, une quinzaine de régénérants ont été choisis au hasard parmi différents génotypes pour l'évaluation de la variation somaclonale par l'analyse d'empreintes génétiques ISSR (inter-simple sequence repeat).

**Mots clés :** Citrus , régénération, assainissement, embryogénèse somatique, stigate, style ,  
variation Somaclonale

### تجديد وتنقية لحمضياتا بتوليد الأجنة الجسمية انطلاقاً من زراعة أنسجة القلم و الميسم

**الملخص:**

تعد تقنية توليد الأجنة الجسمية انطلاقاً من زراعة أنسجة قلم وميسم الزهرة من أهم الطرق الفعالة لتجديد معظم أنواع حمضيات جنس "Citrus" دون إحداث لظهور التباينات الجسمية. ومن جهة ثانية، يبدو أن هذه التقنية جد فعالة للتخلص من أهم الأمراض الفيروسية وبالخصوص تلك التي تصيب الحمضيات. لقد تم تطبيق هذه التقنية على 35 نمطا وراثيا من مختلف أنواع المجموعة الوطنية للحمضيات: (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *C. limon* (L.) Burm, *C. reticulata* Blanco, *C. paradisi* Macfad, *C. reshni* Hort. ex Tan., *C. jambhiri* Lush et *C. maxima* (Burm.) Merrill ) لقد تم اختبار الأنماط الوراثية، مصدر الأزهار، لوجود أهم الفيروسات والفيروسات المشابهة باستعمال التقنيات البيولوجية المصلية والجزئية. تمت الإصابة أساسا بالعدوى الفيروسية والفيروسية لمعظم الأنماط الوراثية. ولقد تمت زراعة الأقسام الزهرية في الظروف المخبرية، قصد الحصول على الأجنة الجسمية. تتكون الكالوسات في قاعدة الأقسام المزروعة. تظهر الأجنة الجسمية ما بين 38 و150 يوما من الزراعة الأولية. تم التأقلم في الظروف الطبيعية للبادرات المتجددة من الأجنة الجسمية، بواسطة التطعيم على حامل الطعم. بعد تقويم الحالة الصحية، لم يلاحظ أي وجود للفيروسات والفيروسات وأشبه الفيروسات داخل النباتات الأم التي تم تجديدها انطلاقاً من الأجنة الجسمية. وحتى تتمكن من التأكد من الثبات الوراثي للنباتات المتجددة، تم أخذ خمسة عشر منها عشوائياً قصد تقييم التباين الجسيمي بواسطة تحاليل البصمة الوراثية.

**الكلمات المفتاحية:**

*Citrus* التجديد, إتخلصاً من , توليد الأجنة الجسمية , قلم وميسم , التباين الجسيمي . لأمراض

## *Dédicace*

*À la mémoire de celui qui me manquera toujours, mon frère Abd El Hamid, qui m'a toujours encouragée et soutenue avec amour et affection*

*A Celui qui m'a indiqué la bonne voie... à mon père, que dieu le protège. J'espère que je serai toujours à la hauteur de ses espérances. Ce Mémoire est l'aboutissement de ses efforts*

*A Celle qui a attendu avec amour les fruits de sa patience, que dieu me la protège.... à ma mère, qui m'a soutenue et entouré avec beaucoup d'affection. Je t'aime plus que tout au monde.*

*A mes frères Nouredine, Khaled et mes sœurs Lalia, Naïma, Fouzia et Kheira pour leur soutien et leur amour.*

*A mes belles sœurs*

*A mes neveux et nièces, merci d'être le bonheur de ma vie.*

*A tous ceux qui m'ont aidé et encouragé*

*Malika*

# *Remerciements*

*Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, Monsieur **Boudjeniba M.** Professeur à l'ENS-Kouba (Alger) qui a encadré ce travail avec beaucoup d'intérêt et d'optimisme. Je le remercie également pour la patience, pour l'intérêt constant qu'il a manifesté pour ce travail et ses conseils éclairés.*

*Je remercie profondément Madame **D'Onghia A.M.**, Co-directeur de thèse et Responsable du secteur IPM IAM de Bari, Italie pour les conseils et les encouragements qu'elle a su me prodiguer au cours de ma thèse avec beaucoup de confiance et de pédagogie. Tout au long de ces années, elle s'est fortement investie dans l'orientation de mes travaux de recherche, en me faisant découvrir de nouveaux concepts.*

*Je souhaite remercier le Professeur **Francesco Carimi** Directeur du CNR de Palerme Italie, pour sa confiance et son soutien quasi inconditionnel durant ces années de thèse. Je lui suis reconnaissante de son accueil dans son laboratoire, de sa patience, et de la disponibilité dont il a fait preuve pour discuter certains des aspects scientifiques et techniques du sujet mais aussi, pour résoudre les difficultés que j'ai rencontrées durant mon expérimentation.*

*J'aimerais adresser un remerciement particulier à Monsieur **Khaled Djelouah**, chercheur à l'IAM de Bari, pour son aide, sa gentillesse et son soutien dans toutes les étapes de réalisation de cette thèse. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance et mon amitié.*

*Dans la gratitude, j'adresse un grand merci au **Dr Dajana Frasheri** et au **Dr Angela Cara** pour leur encadrement, leur gentillesse et disponibilité sans failles. Merci pour m'avoir formée à toutes les techniques de laboratoire. Merci aussi pour tout le reste !!!!*

*Mes sincères sentiments de respect s'adressent à Monsieur **Bouzned Z.**, Professeur à l'ENSA - El Harrach (Alger) pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma thèse. Je le prie de recevoir l'expression de ma grande reconnaissance.*

*A Madame **Boureghda H.** Maitre de conférences à l'ENSA - El Harrach (Alger), veuillez agréer le témoignage de ma profonde gratitude pour l'honneur que vous me faites en acceptant de bien vouloir participer à mon jury de thèse.*

*Je suis honoré que Monsieur **Saadi A.** Professeur à l'université Hassiba Benbouali de Chlef, ait accepté d'être membre du jury de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.*

*Mes remerciements s'adressent à Monsieur **Setti B.** Maitre de conférences A à l'université Hassiba Benbouali Chlef pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.*

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au directeur de l'ITAFV Monsieur **Mandil** pour m'avoir accueillie au sein de son Institution afin de me permettre de réaliser mon travail*

*Je remercie tous les membres du laboratoire central pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler. Les nombreuses discussions que j'ai pu avoir avec chacune d'elles m'ont beaucoup apporté. Merci donc à **Mm Raji H., Mm Haddad N., Melle Boukhalfa S., Mm Ghazli et Mm Branci S.** Je voudrais exprimer particulièrement toute ma Gratitude à **Mm Haddad N. et Melle Boukhalfa S.** Il m'est impossible de trouver des mots pour dire à quel point je leur suis reconnaissante pour leur précieuse aide, sans elles mon expérimentation n'aurait pas pu voir le jour.*

*Ma reconnaissance et appréciation vont aussi à Monsieur **M'hammedi Bouzina** Professeur à l'ISA de Chlef dont les Conseils me furent d'un grand secours pour mener à bien la rédaction de ce mémoire*

*Un grand merci et je vous souhaite à tous mes meilleurs vœux*

***Meziane Malika***

## *Liste des abréviations*

<b>C</b>	:	Citrus
<b>CcaVd</b>	:	Citrus cachexia viroid
<b>CEVd</b>	:	Citrus exocortis viroid
<b>CIVV</b>	:	Citrus infectious variegation virus
<b>CLAM</b>	:	Comité de Liaison des Agrumes Méditerranéens
<b>CPsV</b>	:	Citrus Psorosis Virus
<b>CTV</b>	:	Citrus tristeza virus
<b>DAS ELISA</b>	:	Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>D.O</b>	:	Densité optique
<b>EPPO</b>	:	European and Mediterranean Plant Protection Organization
<b>FAO</b>	:	Food and Agriculture Organization
<b>HLB</b>	:	Huanglongbing
<b>HSVd</b>	:	Hop stunt viroid
<b>IAM</b>	:	Institut Agronomique Méditerranéen
<b>INRA</b>	:	Institut National de la Recherche Agronomique
<b>IPM</b>	:	Integrated pest management
<b>ITAFV</b>	:	Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne
<b>MADR</b>	:	Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
<b><math>\mu</math>l</b>	:	Microlitre
<b><math>\mu</math>M</b>	:	Micromole
<b>MT</b>	:	Millions de tonnes
<b>nm</b>	:	Nanomètre
<b>PCR</b>	:	Polymerase chain reaction
<b>Pb</b>	:	Paire de bases
<b>Rpm</b>	:	Rotation par minute (round per minute/tours par minute)
<b><i>S. citri</i></b>	:	<i>Spiroplasma. Citri</i>
<b>RT-PCR</b>	:	Reverse transcription polymerase chain reaction
<b>TAS-ELISA</b>	:	Triple Antibody Sandwich
<b><math>\mu</math>M</b>	:	Micromorgan

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b>	Position taxonomique des agrumes (Swingle, 1948).....	06
<b>Figure 2:</b>	Répartition des agrumes en Algérie (Swingle, 1948).....	10
<b>Figure 3:</b>	<i>Toxoptera citricida</i> (Grafton-Cardwell, 2012).....	13
<b>Figure 4:</b>	Différents symptômes provoqués par <i>Citrus tristeza Virus</i> (Roistacher, 2010).....	14
<b>Figure 5:</b>	Symptômes de psorose sur arbre infecté (Roistacher, 2010).....	16
<b>Figure 6:</b>	Symptômes associés à la panachure infectieuse sur agrumes (Davino <i>et al.</i> , 1988).....	17
<b>Figure 7:</b>	Symptômes caractéristiques de la concavité gommeuse (Roistacher, 2010).....	19
<b>Figure 8:</b>	Symptômes d'Impietratura sur fruits (Roistacher, 2010).....	20
<b>Figure 9:</b>	Symptôme de cristacortis sur mandarinier greffé sur bigaradier (Roistacher, 1991).....	20
<b>Figure 10:</b>	Symptômes d'exfoliation d'écorce induits par <i>Citrus exocortis</i> Viroïd (CEVd) sur Trifoliata (Roistacher, 1991).....	21
<b>Figure 11:</b>	Symptômes de Cachexie induit par CCaVd. (Roistacher, 1991).....	22
<b>Figure 12:</b>	La cicadelle <i>Circulifer haematoceps</i> (Labroussaa, 2010).....	24
<b>Figure 13:</b>	Symptômes de stubborn (Roistacher, 2010).....	25
<b>Figure 14:</b>	Symptômes du greening.....	26
<b>Figure 15:</b>	Diagramme général de la procédure du microgreffage (Navarro <i>et al.</i> , 1975).....	33
<b>Figure 16:</b>	Etapes de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de stigmate et style <i>in vitro</i> (Carimi, 2003).....	38
<b>Figure 17:</b>	Boutons floraux des différentes espèces d'agrumes.....	45
<b>Figure 18:</b>	La mise en culture du style et stigmate <i>in vitro</i> .....	54
<b>Figure 19:</b>	Symptômes observés sur les différents indicateurs inoculés.....	60
<b>Figure 20:</b>	Electrophorèse sur gel d'agarose des Produits RT-PCR par l'utilisation des amorces spécifiques au HSvd.....	63
<b>Figure 21:</b>	Electrophorèse sur gel d'agarose des produits RT-PCR par l'utilisation d'amorce spécifique au CEVd .....	63

<b>Figure 22:</b>	Profil électrophorétique obtenu sur gel d'agarose 1,2 % d'un test PCR pour la détection du <i>S. citri</i> utilisant des amorces spécifiques (P ).....	64
<b>Figure 23:</b>	Formation des cals à partir de style\stigmaté de <i>C.sinensi</i> «Double fine améliorée» après 4 jours d'incubation.....	67
<b>Figure 24:</b>	Pourcentages de callogenèse chez différents génotypes de <i>C. limon</i> .....	70
<b>Figure 25:</b>	Pourcentages de callogenèse chez différents génotypes de <i>C. sinensis</i> .....	70
<b>Figure 26:</b>	Pourcentages de callogenèse chez le groupe de mandariniers.....	71
<b>Figure 27:</b>	Pourcentages de callogenèse chez <i>C. paradisi</i> .....	71
<b>Figure 28:</b>	Pourcentages de callogenèse chez <i>C.maxima</i> .....	72
<b>Figure 29:</b>	Brunissement des cals.....	72
<b>Figure 30:</b>	Formation des embryons somatiques à partir des génotypes de <i>C. limon</i> .....	74
<b>Figure 31:</b>	Différents stades de formation d'embryons somatiques Chez Femminello « <i>C.limon</i> » à partir de la culture de style et stigmaté <i>in vitro</i> .....	75
<b>Figure 32:</b>	Le pourcentage d'embryons somatiques formés à partir de style et stigmaté de différent génotype de <i>C.limon</i> après 5 mois de culture.....	76
<b>Figure 33:</b>	Le pourcentage d'embryons somatiques formés à partir de style stigmaté de différent génotype de <i>C.Sinensis</i> après 5 mois de culture.....	76
<b>Figure 34:</b>	Formation des embryons somatiques à partir des cals de <i>C. maxima</i> «Pomélo Roby».....	77
<b>Figure 35:</b>	Germination des embryons somatiques de <i>C.limon</i> «Dellys».....	79
<b>Figure 36:</b>	Conversion des embryons somatiques de <i>C.limon</i> « Dellys » en plantules (Photo prise après un mois de transfert dans les tubes à essais).....	79
<b>Figure 37:</b>	Acclimatation des plantules régénérées par l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmaté.....	80
<b>Figure 38:</b>	Gel représentant les empreintes génomiques ISSR (ENEA34 ) de plant mère et des plantes régénérées issues de <i>C. sinensis</i> (Washington Navel)	83
<b>Figure 39:</b>	Gel représentant les empreintes génomiques ISSR des plants mères et des plants régénérés issus de <i>C. limon</i> (Dellys, Bornéo et Beni Abbés) et <i>C. sinensis</i> (Washington Navel et Metidja Navel).....	83

# Liste des tableaux

<b>Tableau I:</b>	Patrimoine Agrumicole détenu par l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et Viticole (INRAA, 2006).....	11
<b>Tableau II:</b>	Problèmes phytosanitaires des agrumes en Algérie (Kerboua <i>et al.</i> , 2001).....	28
<b>Tableau III:</b>	Génotypes régénérés par embryogenèse somatique à partir de la culture de tissus floraux (Carimi <i>et al.</i> , 2001).....	36
<b>Tableau IV:</b>	Différentes espèces et variétés d'agrumes testées par la culture de style / stigmate <i>in vitro</i> .....	45
<b>Tableau V:</b>	Liste des indicateurs ligneux utilisés pour l'indexage biologique (Roistacher, 1991).....	46
<b>Tableau VI:</b>	Liste des amorces de la multiplex RT-PCR.....	49
<b>Tableau VII:</b>	Paires d'amorces utilisées pour la PCR.....	51
<b>Tableau VIII:</b>	Amorces utilisées pour l'évaluation de la conformité génétique.....	57
<b>Tableau IX:</b>	État sanitaire des plants mères source d'explants (Style \ stigmate) analysées par le test ELISA.....	60
<b>Tableau X:</b>	Résultats de l'utilisation de RT-PCR pour la détection des viroïdes chez les plants mère source d'explants «Style \ stigmate».....	61
<b>Tableau XI:</b>	Importance des cals produit des différents génotypes d'agrumes étudié.....	67
<b>Tableau XII:</b>	Différentes périodes de différenciation embryonnaire chez génotypes de <i>C. senensis</i> et <i>C. limon</i> .....	72
<b>Tableau XIII:</b>	Empreintes génomiques ISSR des pieds mères et des plants régénérés issus de <i>C.limon</i> (Dellys, Bornéo et Beni Abbés) et <i>C. sinensis</i> (Washington Navel et Metidja Navel).....	81

# Table des matières

*Remerciements*

*Résumé*

*Liste des abréviations*

*Liste des tableaux*

*Liste des figures*

*Introduction générale*

## ***DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES***

<b>Chapitre I. Généralités sur les agrumes.....</b>	<b>04</b>
1.1. Origine géographique et dispersion .....	04
1.2. Classification des agrumes.....	05
1.3. Caractère botanique du genre <i>Citrus</i> Linn.....	07
1.4. L'agrumiculture en Algérie.....	09
1.4.1. Historique.....	09
1.4.2. Importance des agrumes en Algérie.....	10
<b>Chapitre II. Maladies importantes des agrumes transmissibles par greffage dans le monde.....</b>	<b>12</b>
2.1. La Tristeza «Citrus Tristeza Virus : CTV».....	12
2.2. Psorose écailleuse «Citrus psorosis Virus : CPsV».....	15
2.3. Panachure infectieuse «Citrus infectious variegation virus :CIVV».....	17
2.4. Maladies à Oakleaf pattern «Feuille de chêne».....	18
2.4.1. La concavité gommeuse.....	18

2.4.2. Impietratura.....	19
2.4.3. Cristacortis.....	20
2.5. Les viroïdes des agrumes.....	21
2.5.1. L'exocortis ( <i>Citrus exocortis</i> Viroid CEVd).....	21
2.5.2. La cachexie ( <i>Citrus cachexia</i> Viroid, CCaVd).....	22
2.5.3. Détection de CEVd et CCaVd.....	23
2.6. Stubborn des agrumes « <i>Spiroplasma citri</i> ».....	23
2.7. Le greening des agrumes ou Huanglongbing «HLB».....	25
2.8. Situation phytosanitaire des agrumes en Algérie.....	27
<b>Chapitre III : Les techniques d'assainissement des agrumes.....</b>	<b>29</b>
3.1. L'embryogenèse nucellaire .....	29
3.2. La thermothérapie.....	30
3.3. Le micro-greffage d'apex <i>in vitro</i> .....	31
3.4. L'embryogenèse somatique .....	34
3.4.1. L'embryogenèse somatique : Historique et application chez les agrumes.....	34
<b>Chapitre IV : L'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigate <i>in vitro</i>.....</b>	<b>36</b>
4.1. Les principales étapes de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigate <i>in vitro</i> .....	23
4.1.1. Milieu de culture.....	23
4.1.2. Conditions de culture.....	23

4.1.3. Les régulateurs de croissance.....	24
4.2. Fidélité génétique des plants d'agrumes régénérés.....	24

## ***PARTIE EXPERIMENTALE***

<b>Chapitre V : Matériel et Méthode.....</b>	<b>35</b>
5.1. Origine du matériel végétal .....	35
5.2. Evaluation de l'état phytosanitaire .....	35
5.2.1. L'indexage biologique.....	36
5.2.2. Les techniques sérologiques.....	36
5.2.3. Les techniques moléculaires. ....	36
5.2.3.1. Détection des viroïdes.....	36
5.2.3.2. Détection du <i>Spiroplasma citri</i> .....	36
5.3. Technique de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate.....	39
5.3.1. Préparation du milieu de culture. ....	39
5.3.2. Préparation de l'explant.....	39
5.3.3. Régénération de plantules.....	39
5.3.4. Acclimatation .....	40
5.3.5. Diagnostic phytosanitaire des plantules régénérées. ....	42
5.3.6. Analyse des résultats .....	42
5.4. Evaluation de la conformité génétique des plants d'agrumes régénérés.....	45
5.4.1. Extraction de l'ADN génomique.....	46
5.4.2. Protocole d'extraction de l'ADN totale.....	47
5.4.3. Purification de l'ADN.....	48

5.4.4. L'empreintes digitales ISSR.....	49
5.4.5. Analyse des résultats.....	49
<b>Chapitre IV : Résultats et discussions</b> .....	49
6.1. L'état phytosanitaire du matériel végétal utilisé.....	49
6.1.1. L'indexage biologique .....	50
6.1.2. Techniques sérologique «ELISA».....	51
6.1.2.1. Détection des virus.....	52
6.1.3. Les techniques moléculaires. ....	52
6.1.3.1. Détection des viroïdes.....	52
6.1.3.2. Détection du <i>Spiroplasmacitri</i> .....	53
6.2. Technique de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate.....	54
6.2.1. L'aptitude à la callogenèse.....	54
6.2.2. Le potentiel embryogène des différents génotypes. ....	54
6.2.3. Germination des embryons somatiques.....	54
6.2.3.1. Acclimatation des plantules régénérées.....	54
6.2.3.2. Evaluation de l'état sanitaire des plantules régénérées.....	55
6.3. Evaluation de la conformité génétique des plants d'agrumes régénérés.....	55

## ***Conclusion générale***

## ***Publications***

## ***Références bibliographiques***

## ***Annexes***

# *Introduction générale*

Parmi toutes les cultures arboricoles et leur importance socio-économique dans le monde, l'agrumiculture constitue l'un des principaux secteurs de l'économie internationale. Elle constitue par son tonnage l'une des trois premières productions fruitières mondiales devant les groupes des bananes et du raisin (Loeillet, 2008). Les besoins des populations en ce produit ne cessent de croître à cause de sa valeur nutritionnelle.

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que la consommation des agrumes serait reliée à la prévention de certaines maladies cancéreuses du tube digestif et des maladies cardiovasculaires due à l'effet de plusieurs composants tels que la vitamine C, les caroténoïdes, les flavonoïdes et les limonoïdes (Dhuique-Mayer, 2007).

Les superficies agrumicoles ont atteint une superficie de 8,6 millions d'hectares (FAO, 2008). Ces superficies ont connu une progression continue dans les 140 pays producteurs à travers le monde, 70% de ces derniers sont localisés dans l'hémisphère nord dont 20 % dans la région méditerranéenne.

Selon LebdiGrissa(2010), la production des agrumes comprend 62 MT d'oranges (Navel, Maltaises, Sanguines, Valencia late...), 22 MT de petits fruits (Satsumas, Clémentines, Mandarines, Wiking...), 12 MT de limons (Citrons, Limes) et 12 MT de pamplemousses. Dans la région méditerranéenne, 16 à 17 MT sont produites par les 12 pays membres du Comité de Liaison des Agrumes Méditerranéens (CLAM).

L'Algérie détient une collection variétale composée de 256 variétés d'agrumes, ce qui représente un patrimoine génétique inestimable (Larbi *et al.*, 2009).

Le verger agrumicole algérien se localise essentiellement dans les plaines irrigables en raison de son exigence en eau et en qualité de sol (Karboa, 2001). Il s'étend sur une superficie de 64 154 ha dont 50 873 ha en rapport (MADR, 2011).

Cependant, ce patrimoine arboricole a connu une réduction de son potentiel productif suite à la détérioration de son état physiologique et phytosanitaire dûe essentiellement au vieillissement des arbres, au manque de sélection variétale et clonale et à l'emploi de matériel végétal non sélectionné atteint de maladies à virus et/ou de type viral. Effectivement plusieurs maladies liées aux virus et aux virus similaires ont été signalées en Algérie par Bovè(1995).

Selon Karboa (2001), plusieurs maladies de dégénérescence transmissibles par greffage ont été détectées dans les vergers algériens tels que le stubborn (*Spiroplasma citri*) et l'exocortis (CEVd). A cela s'ajoutent les psoroses (CPsV), la Tristeza (CTV) et la gommose parasitaire (*Phytophthora citrophthora* et *Phytophthora parasitica*). Pour faire face à ces problèmes, la prévention par l'utilisation d'un matériel de propagation sain est l'unique méthode de lutte contre ces maladies.

Plusieurs programmes de plantation et rénovation des vergers agrumicoles ont été lancés en Algérie depuis 2001. Ils sont basés essentiellement sur l'assainissement, l'amélioration et la multiplication des plants d'agrumes sélectionnés et indemnes de maladies à virus, à viroïdes et à phytoplasmes.

Des techniques conventionnelles classiques (semis, marcottage, bouturage et greffage) et les techniques de culture *in vitro*, dont la plus ancienne est la culture du nucelle, sont employées pour assainir et produire des plants d'agrumes en grande quantité. Mais toutes ces techniques présentent des inconvénients tels que la difficulté dans l'assainissement de certains génotypes infectés et l'étalement du stade de juvénilité.

Selon Navarro *et al.* (1993), la thermothérapie permet l'éradication des maladies et l'obtention des plants d'agrumes sains avec absence de caractères juvéniles. Malheureusement, cette thérapie s'avère inefficace dans l'élimination des agents pathogènes thermorésistants (viroïdes, *Spiroplasma citri*). Bien au contraire, la réplication de ces derniers est favorisée par les hautes températures (Mink *et al.*, 1998).

Avant 1975, l'embryogénie nucellaire était la seule méthode utilisée pour produire et assainir les agrumes. Cependant, suite au problème associé à cette technologie tel que l'induction des caractères de juvénilité et la régénération des variants (Navarro *et al.*, 1985), le micro greffage *in vitro* est apparu comme une technique idéale pour la multiplication des agrumes et très efficace dans l'éradication des pathogènes transmissibles par le greffage.

Cependant, l'éradication du virus de la psorose écailleuse à partir des plants d'agrumes infectés, semble difficile par la technique du micro-greffage d'apex uniquement (60% d'éradication). L'élimination du CPsV implique l'association du micro-greffage à la thermothérapie (Carvalho *et al.*, 2002)

La technique de l'embryogénèse somatique intégrée dans les programmes de régénération des plants d'agrumes apparaît comme un outil puissant puisqu'elle permet de régénérer des taux très élevés de plants indemnes de maladies (Ollitaul, 1992).

L'embryogenèse somatique particulièrement celle obtenue à partir de la culture de stigmate et de style a été mise au point par Carimiet *al.* (1994). Cette technique a permis de régénérer des plants d'agrumes sains et génétiquement identiques à la plante mère (D'Onghiaet *al.*, 2000a). C'est une voie de régénération très efficace dans l'élimination des maladies de dégénérescence. Même le potentiel productif des plants produits devient considérable.

Caruso *et al.* (2000) ont rapporté que l'embryogenèse somatique peut être utilisée comme une méthode alternative à la culture du nucelle et au micro-greffage d'apex pour l'assainissement des agrumes. Elle permet l'obtention des plants génétiquement identiques (true-to-type) (Quashie et Koukou, 2009; Cassells *et al.*, 2000)

Compte tenu des avantages qu'offre la technique de l'embryogenèse somatique *via* style et stigmate dans la régénération et l'assainissement des agrumes, nous avons décidé de la tester sur différents géotypes de la collection nationale des agrumes maintenus au niveau de l'ITAFV Alger.

Dans une première partie de notre étude, nous nous sommes intéressé à l'évaluation de l'état phytosanitaire de tous les géotypes (autochtones et importés) testés par cette technique et ce par l'utilisation des différentes méthodes de diagnostics (biologique, sérologique et moléculaire) au niveau du laboratoire d'IPM de l'IAM de Bari en Italie.

Dans une seconde partie, l'ensemble des géotypes étudiés ont été régénérés par l'application pour la première fois et dans des conditions algériennes la technique de l'embryogenèse somatique via la culture de style et stigmates *in vitro* au niveau de laboratoire des cultures *in vitro* de l'ITAFV Alger.

La dernière partie de notre travail est consacrée à l'évaluation du niveau d'assainissement des plantules régénérées à partir des géotypes infectés ainsi qu'à l'évaluation de la conformité génétique de quelques régénérants.

La réussite de cette entreprise contribuera sûrement à la préservation et à la valorisation de notre patrimoine agrumicole. L'intégration de la technique de l'embryogenèse somatique à partir du style et du stigmate dans les programmes d'assainissement et de certification des agrumes en Algérie permettra la production d'un matériel de propagation indemne et préformant dont l'utilisation contribuera à la relance de l'agrumiculture en Algérie.

## Chapitre I : Généralités sur les agrumes

### I.1. Origine géographique et dispersion

Les agrumes sont originaire du sud-est de l'Asie, bien que leur culture a probablement commencé en Chine (Peña *et al.*, 2007). Selon Praloron (1971), la détermination du centre d'origine des agrumes se complique du fait que l'hybridation naturelle interspécifique et intergénérique est très fréquente dans ce groupe et crée des espèces que Tanaka appelle éléments secondaires qui se reproduisent par semis. Avec le rayonnement des civilisations chinoises au cours du premier millénaire avant notre ère, la culture des agrumes commence à se propager dans les pays avoisinants: sud du Japon et archipel de Malaisie.

D'après une carte de diffusion des agrumes de Praloron (1971), la zone méditerranéenne n'a connu cette culture qu'au 7<sup>ème</sup> siècle avant notre ère. Les cédratiers sont les premiers agrumes cultivés sous le nom de pomme de Médie. Mais ce n'est qu'aux alentours de l'an 1400, bien après le voyage de Marco Polo en Chine en 1287, que les Portugais introduisirent l'oranger en méditerranée.

Du bassin méditerranéen, les agrumes se sont répandus dans le monde par trois voies : les Arabes assurent leur diffusion sur la côte Est d'Afrique jusqu'au Mozambique, Christophe Colomb les importe à Haïti en 1493 et les Anglo-Hollandais les introduisent au Cap en 1654.

Actuellement, les agrumes occupent la première place des productions fruitières dans le monde avec 120 millions de tonnes et une superficie de 8.6 millions d'hectares (FAO, 2008). Elle constitue, par son tonnage, l'un des principaux secteurs de l'économie internationale.. L'essentiel de la production est concentré dans le nord de l'hémisphère. Le bassin méditerranéen représente à lui seul 20% de la production avec un producteur majeur qui est l'Espagne.

Le groupe des agrumes est très hétérogène. Le cédratier «*C.medica*» fut la première espèce connue en Europe. Le bigaradier «*C.aurantium*» le citronnier «*C.limon*» et l'oranger «*C.sinensis*» n'ont été introduits dans le bassin méditerranéen que vers la moitié du XII<sup>e</sup> siècle, et le mandarinier «*C.reticulata*» au XIX<sup>e</sup> siècle.

En volume de production, les oranges sont le premier groupe variétal avec plus de 60% des volumes, suivies par les petits agrumes avec environ (22%) des volumes produits. Les citrons/limes et les pomelos arrivent respectivement en troisième (12%) et quatrième position

(4%) de la production mondiale. Les agrumes qualifiés d'exotiques «cédrat, kumquat, etc» ne représentent qu'une infime partie de l'offre mondiale (Loeillet, 2008)

Aussi, Germana (2005) rapporte que les espèces d'agrumes les plus commercialisées sont les oranges *Citrus sinensis* L. Osbeck et les mandarines *C. unshiu* Marc., *C. nobilis* Lour., *C. deliciosa* Ten, *C. reticulata* et leurs hybrides représentant 80% des vergers agrumicoles à travers le monde suivie par les citrons *C. limon* L. Burm.f., limes *C. aurantifolia* Christm. Swing. et le Pomélo *C. paradisi* Macf. Le taux de production et consommation de ces trois dernières espèces est presque égal.

D'autres espèces, comme les oranges aigres «*C. aurantium* L.», les cédratiers «*C. medica* L.» et les bergamotes «*C. bergamia* Risso et Poit.» sont d'une importance relative dans certaines régions. En outre, quelques hybrides commerciaux sont utilisés comme porte greffes : tels que le citrange (*Citrus sinensis* X *Poncirus trifoliata*), le citrumelos (*C. paradisi* X *Poncirus trifoliata*), les tangelos (*Citrus paradisi* X *Citrus reticulata*) et tangor (*Citrus reticulata* X *Citrus sinensis*) ainsi que les variétés hybrides de mandariniers (Peña *et al.*, 2007).

## I.2. Classification des agrumes

Swingle (1948) fait remarquer que de nombreux genres, plus ou moins voisins de ceux composants les agrumes, ont une grande importance non seulement en matière de phylogénie de ces plantes mais encore comme source de matériel végétal possédant des caractères intéressants comme la résistance ou l'adaptation aux conditions de milieu (Praloron, 1971). L'aptitude particulièrement développée chez les agrumes à s'hybrider avec de nombreuses espèces des genres proches et à se greffer sur elles, confère à ces dernières un intérêt certain pour les études d'amélioration du matériel végétal.

La classification systématique des agrumes est qualifiée de complexe et des divergences se manifestent entre les opinions de Swingle (1948), Tanaka (1954), Chapot (1955), Hume (1957) et Hodgson (1967). Cependant, selon Praloron (1971), quoi qu'il en soit de ces divergences la classification de Swingle (Figure 1) est la plus utilisée. Ce même auteur rapporte que dans la famille des *Rutaceae*, tribu des *Citreae*, sous-tribu des *Citrinae* et, à l'intérieur de celle-ci on distingue trois groupes à fruits primitifs, à fruits proches des agrumes et à fruits d'agrumes vrais. Ce dernier englobe trois genres: *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus*.

D'après Sadok (1983), les caractères distinctifs des plantes appartenant à la famille des *Rutaceae* résident dans la structure très singulière de leur fruits qu'on qualifie d'hespéridés, de leurs androcées fréquemment polyadelphes, de leur nombreux carpelles multi-ovulés, concrescents par toute la région ovarienne et de leurs graines exalbuminées.

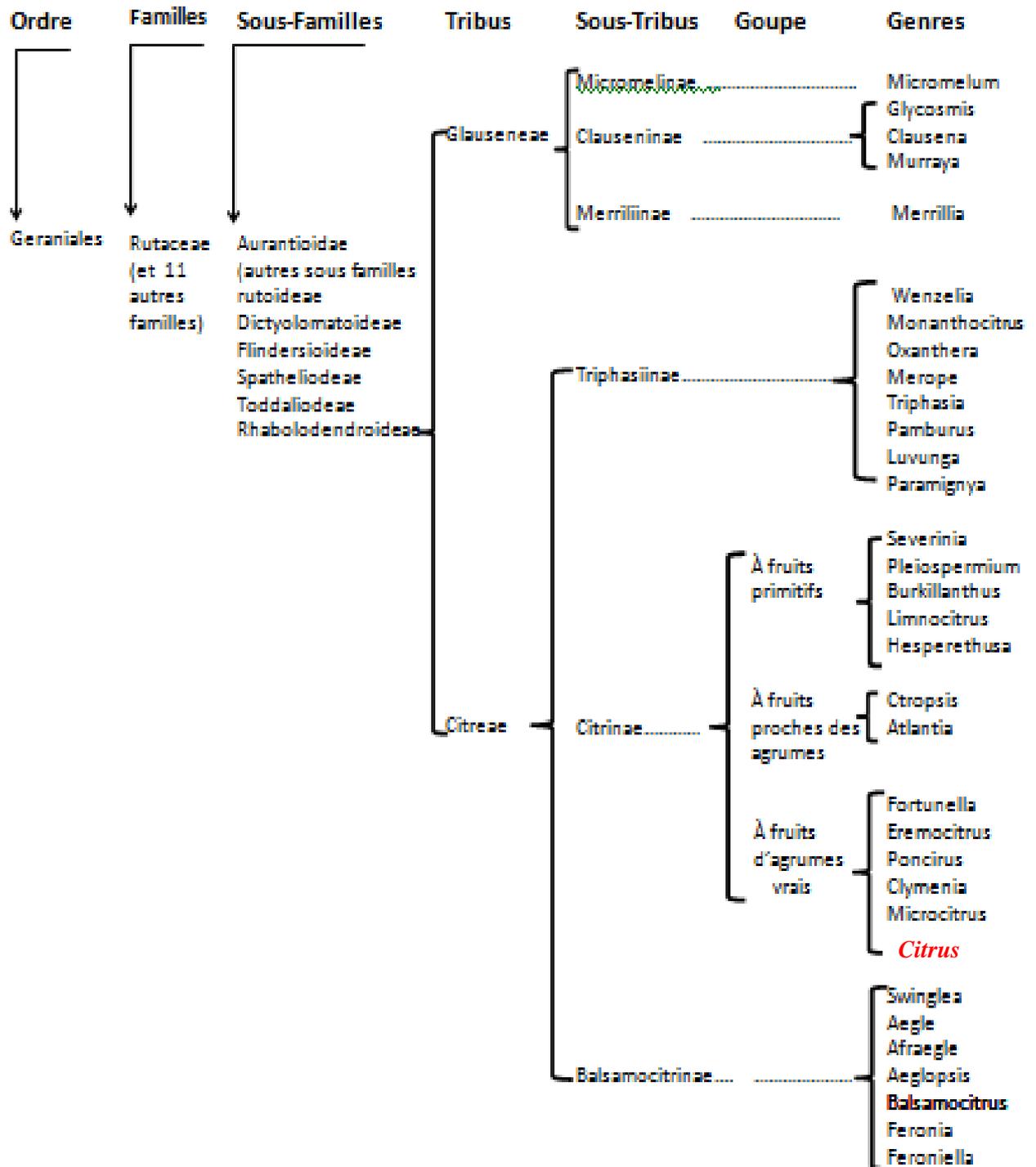


Figure 1: Position taxonomique des agrumes (Swingle, 1948).

### I.3. Caractère botanique du genre *Citrus* Linn.

Swingle (1948), décrit les caractères distinctifs généraux du genre *Citrus*. Ce sont des petits arbres dont les jeunes **rameaux** sont cylindriques et épineux mais leurs branches âgées sont fréquemment inermes. Les **feuilles** sont persistantes, minces et non coriaces avec des veines principales peu nombreuses. Le pétiole plus ou moins ailé est articulé avec le limbe sauf dans le cas de l'espèce *C. medica*.

**Les fleurs** sont solitaires ou en petites grappes corymbiformes, parfaites ou mâles par avortement plus ou moins du pistil, calice à 4 ou 5 sépales, le nombre d'étamines est généralement quatre fois supérieur à celui des pétales et parfois 6 à 10 fois plus nombreux. L'ovaire est plus globuleux et bien distinct du style mince, ou tronqué, fusiforme ou subcylindrique passant progressivement à un style d'épaisseur voisine à celle de la partie supérieure de l'ovaire. Le style se termine brusquement en un stigmate subglobuleux ou en sphère aplatie.

**Le fruit** est formé de segments contenant des graines placées dans l'angle intérieur. Les segments sont entourés d'un endocarpe blanc à l'extérieur duquel se trouve une écorce à très nombreuses glandes à essence, devenant jaune ou orange à maturité.

Les espèces et variétés commerciales bien connues des agrumiculteurs appartiennent à ce genre sont décrits comme suit (Sadok, 1983):

#### 1) *L'oranger (Citrus sinensis (L.) Osbeck)*

Plus de 1000 variétés sont recensées mais les plus cultivées sont classées en: Orange blonde «Washington Navel, Hamline, Salutiana, Valencia Late, Shamouti, etc...», Orange demi sanguine (la Maltaise demi sanguine ou Portugaise, la Double Fine , etc...)

#### 2) *Le mandarinier (Citrus reticulata Blanco)*

Parmi les variétés de cette espèce on retiendra les «Tangerines» et la «Clémentine». Les taxonomistes modernes ont érigé au rang d'espèce *Citrus clemetinia*. Les opinions sont partagées à propos de son origine. Selon Praloran (1971), Trabut et Rebour pensent qu'elle est née en Algérie d'un croisement de mandarinier commun avec le bigaradier Granito, tandis que Webber(1943), Tanaka (1954) et Chapot (1963) estiment qu'elle est de souche orientale apparentée au mandarinier Canton.

### 3) *Le citronnier (Citrus limon L. Burn)*

Le citronnier est un arbre vigoureux qui atteint une grande taille quand il est cultivé sous des conditions de milieu qui lui sont favorables. Les fleurs teintées de pourpre et groupées en bouquets, sont remontantes et de grande taille. Un certain pourcentage d'entre elles sont mâles en raison de l'avortement du pistil. Le citronnier craint le froid mais aussi les températures trop élevées. Les variétés les plus courantes sont : Eureka ou quatre saisons et Lisbon.

### 4) *Le bigaradier (Citrus aurantium L.)*

Vulgairement appelé orange amère, le bigaradier est le plus résistant au froid, l'excès d'eau et à la gommose de *phytophthora*. Principalement pour ces qualités, il a été le plus important et le populaire des porte-greffes jusqu'à l'apparition de la Tristeza (Praloran, 1971).

### 5) *Le pomelo (Citrus paradisi Macfayden)*

Grapefruit en anglais, c'est la seule espèce qui ne soit pas originaire du Sud-Est asiatique car elle est apparue aux Antilles. Elle provient d'une mutation de bourgeon ou d'une hybridation du pamplemousse (Praloran, 1971).

### 6) *Le pamplemoussier (Citrus maxima ou Citrus grandis L. Osbeck)*

Bien que formant deux espèces différentes, le pamplemoussier et le pomelo sont assez étroitement apparentés et plusieurs auteurs considèrent que le pomelo n'est qu'une sous espèce ou une variété botanique de *Citrus grandis*.

### 7) *Le Cédratier (Citrus medica L.)*

Les fruits de cette espèce sont habituellement de très grande taille et de forme oblongue terminée par un mamelon. Les pépins sont monoembryonnés. Le cédratier est la seule espèce d'agrumes qui se multiplie par bouturage (Praloran, 1971). Les variétés les plus connues sont le Cédrat de Corse et le Cédrat diamante.

### 8) *Le limetier (Citrus aurantifolia Swingle)*

Les fruits très petits de couleur jaune verdâtre sont de forme sphérique à ovale et se terminent par un court mamelon. Ils présentent une peau lisse très mince à coriace et la pulpe juteuse. Les variétés les plus connues sont la Lime mexicaine appelée citron vert ou lime à petits fruits et la lime à gros fruits dont le type est la variété Bears.

## I.4. L'agrumiculture en Algérie

### I.4.1. Historique

L'introduction de l'oranger en Algérie est ancienne sans qu'il soit possible de la dater avec précision mais le développement de sa plantation caractérise essentiellement l'époque coloniale (Mutin, 1969). Trabut (1905) a affirmé que l'étude de nombreux semis **d'orangers** et mandariniers réalisés en Algérie lui a permis de distinguer déjà un certain nombre de races locales ou de métis très dignes d'être conservés tels que l'orange très précoce de Kabylie, l'orange de Blida, l'orange de Toudja etc...

Le **mandarinier** comme espèce a été introduite par Hardy en 1850 (Trabut et Marès, 1906), et de bonnes variétés ont pu être fixées ensuite par greffage (INRA, 2006).

Au début du siècle une nouvelle espèce qui connaîtra le succès, le **clémentinier**, issu d'une hybridation entre un Mandarinier et un Bigaradier «Granito» a été trouvé, elle doit son nom au frère Clément (INRA, 2006). Cette espèce a été découverte et mise au point en 1902 à Messerghin près d'Oran (Mutin, 1969).

Un grand nombre de variétés autochtones de **citronniers** a été signalé par Trabut (1908), Rebour (1945) et Wagneur (1973). Ce dernier a rapporté l'existence de certaines variétés comme Eureka, Villafranca et Vernia. Selon Masker (1987), les citronniers représentent 2% du verger agrumicole en Algérie. Loussert (1989) mentionne que les principales variétés cultivées en Méditerranée sont: Eureka, Lisbonne, Verne et Femminello Ovale. Plusieurs variétés de Pomelo ont été énumérées par Trabut en 1908. Seulement, sur une demi-douzaine de variétés introduites, on ne connaît qu'une seule qui s'est véritablement imposée: le Pomélo Marsh Seedless (INRA, 2006).

Dans le groupe des agrumes d'intérêt secondaires, sont classés entre autres: le bigaradier, lime, limettier doux, bergamotier, cédratier, kumquat. Les bigaradiers sont très souvent utilisés pour la production de porte-greffe. Trabut (1908) a mentionné quatre variétés de limes, deux Limettes, la Bergammotte ordinaire, huit cédratiers et trois variétés de Kumquat originaires du Japon et introduites en Algérie (INRA, 2006).

### I.4.2. Importance des agrumes en Algérie

Selon Aouane et Ghezli (2001), à l'instar de l'arboriculture fruitière, l'agrumiculture occupe une place primordiale et constitue l'une des préoccupations majeures des décideurs au niveau du ministère de l'agriculture algérien. Le programme de reconversion mis en œuvre vise à réinstaurer l'agrumiculture dans des zones de prédilection à travers une démarche d'adaptation des systèmes de production aux vocations pédoclimatiques de chaque zone.

La culture commerciale des *Citrus* est localisée dans les zones irrigables, dans la partie nord du pays (Figure 2), où elle trouve la température clémente qui assure sa réussite (Rebour, 1948). En effet, le verger agrumicole algérien se localise essentiellement dans la plaine de la Mitidja en raison de son exigence en eau et qualité de sol (Karboa, 2001). L'INRAA en 2006 a rapporté que l'Algérie détient une collection variétale composée de 277 variétés d'agrumes (Tableau I). Cette richesse arboricole constitue un patrimoine génétique inestimable (Karboa, 2001).

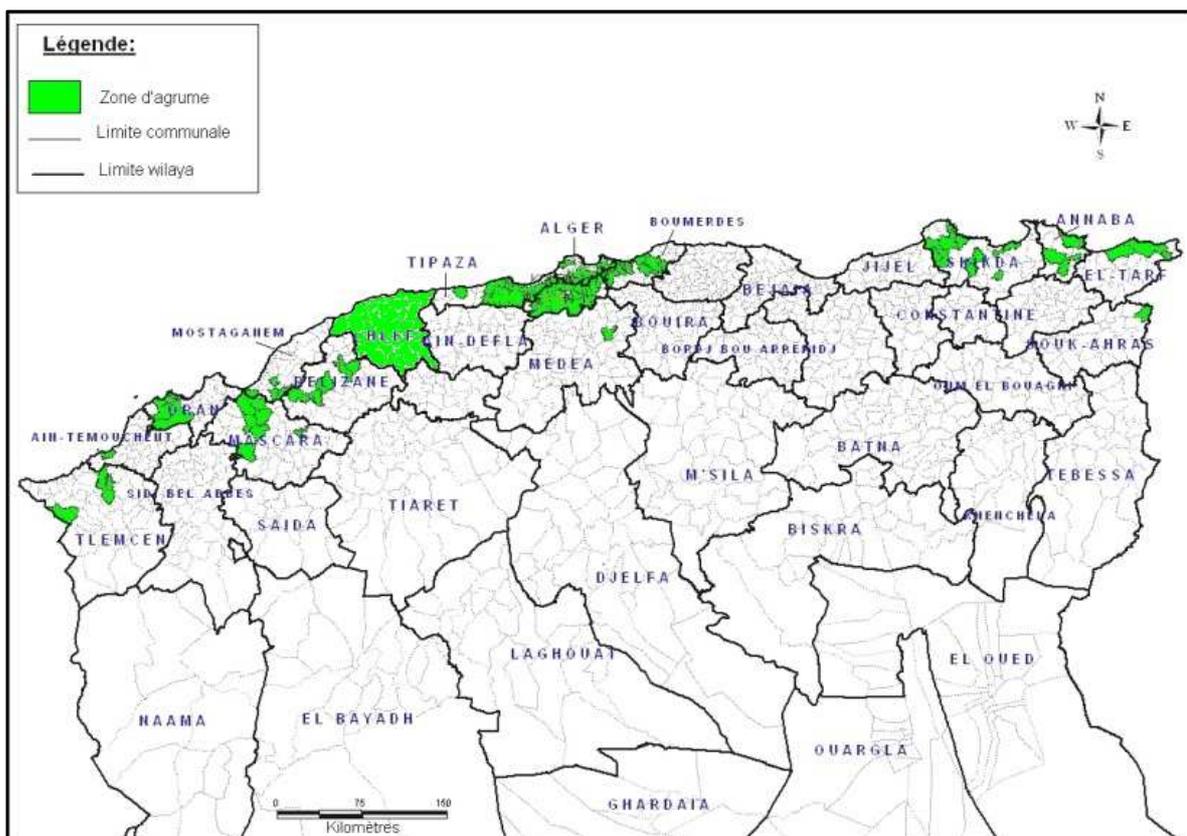


Figure 2 : Répartition des agrumes en Algérie (ITAFV, 2012).

Le verger agrumicole algérien occupe une superficie de 64154 ha dont 50873 ha se répartissent en majorité dans les wilayas de Blida (26%), Chlef (9%) et Alger (8%).

Les principales espèces cultivées dans ces régions sont les oranges, les clémentines, les citrons et les pomelos. En terme de production, l'Algérie a atteint le niveau de 8 552 654 quintaux soit un rendement moyen de 16.8T/ha. Les différentes composantes de cette production sont 72% pour les oranges, 16% pour la clémentine, 7% pour les citrons, 3% pour la mandarine et 0,1% pour le pomelo (MADR, 2009).

**Tableau I:** Patrimoine Agrumicole détenu par l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et Viticole (ITAFV).

Variétés (Nbre Total)	Variétés locales (Nbre)	Variétés étrangères (Nbre)	Variétés utilisées (Nbre)	Variétés homologuées (Nbre)	Variétés non homologuées (Nbre)
277	34	243	09	41	236

**Source:** INRAA (2006).

## **Chapitre II: Maladies importantes des agrumes transmissibles par greffage dans le monde**

Les agrumes sont l'objet d'une diversité de maladies de dégénérescence transmissibles par greffage, occasionnées par des virus, viroïdes, phytoplasmes, ou d'autres procaryotes endocellulaires (Aubert et Vullin, 1997). Les dépérissements provoqués par les viroses paraissent occuper le premier plan par leur gravité et leur impact économique comme dans le cas des variétés ou des associations porte-greffe-greffe sensibles.

Roistacher (1995) rapporte qu'à l'instar des arbres fruitiers, les agrumes sont les plus affectés par les agents transmissibles par greffage qui entraînent le plus souvent le «quick decline» ou bien le déclin rapide et la mort de l'arbre. Dans le cas des variétés et des associations tolérantes, ces affections passent inaperçues (Praloran, 1971). Cependant, elles entraînent parfois un important ralentissement de la végétation et une diminution des rendements (Roistacher, 1995).

Actuellement, tous les vergers agrumicoles à travers le monde sont affectés, plus ou moins sévèrement par des virus et un grand nombre d'agents transmissibles par greffage, qui provoquent de très graves maladies dévastatrices dont les plus importantes sont la Tristeza et le greening «Huanglongbing» (Bové, 2006). Ces deux maladies sont largement transmises par des insectes vecteurs. Néanmoins, l'agent du greening «Liberibacter» n'a pas été signalé dans la région méditerranéenne (OEPP/CABI, 1996).

### **II.1. La Tristeza «*Citrus tristeza Virus* : CTV»**

Le virus de la Tristeza (CTV) est responsable de l'une des maladies les plus destructrices des agrumes à l'échelle mondiale. C'est en 1947, Oberholzer démontre, pour la première fois, que le dépérissement des agrumes greffés sur bigaradier «*Citrus aurantium L.*» est provoqué par un virus. Les dégâts provoqués par la Tristeza sont étroitement liés à la prédominance de l'utilisation du bigaradier comme porte-greffe (Praloran, 1971).

Le CTV, apparemment originaire d'Asie, a été disséminé dans tous les grands bassins agrumicoles mondiaux par des échanges internationaux de matériel végétal contaminé (Lovisol, 1993).

Plus de 70 millions d'arbres ont été décimés par ce virus en Argentine, au Brésil, aux États-Unis et au Vénézuéla. En Espagne, 21 millions d'arbres ont été détruits.

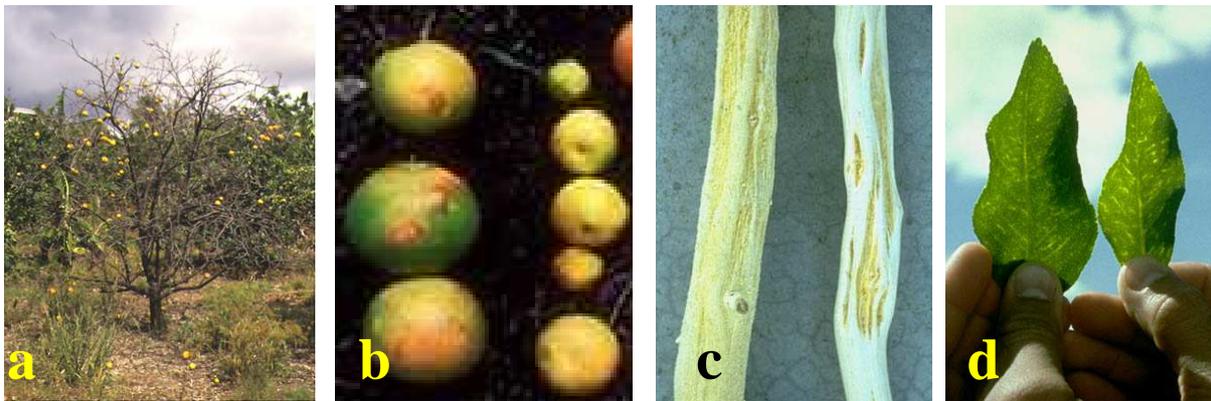
Le *Citrus tristeza* Virus (CTV) des agrumes est un clostérovirus, sa transmission se fait selon un mode semi-persistant par plusieurs espèces de pucerons *Aphis gossypii*, *Aphis spiraecola*, *Toxoptera aurantii* et le puceron brun *Toxoptera citricida* (Figure 3). Ce dernier est efficace et considéré comme un vecteur potentiel dans la transmission et dissémination des souches sévères du CTV (Lee *et al.*, 1992). *T. citricida* a été signalé dans la région nord de la Méditerranée principalement au Portugal et en Espagne (Nieto-Nafría *et al.*, 2005).



**Figure 3:** *Toxoptera citricida* (Grafton-Cardwell, 2012)

- Les symptômes causés par le CTV diffèrent selon les isolats, les espèces d'agrumes et les associations porte-greffe/greffon (Figure 4). Plusieurs souches sont caractérisées :
  - Seedling yellows (CTV-SY)
  - Quick Decline ou Tristeza (CTV-T)
  - Stem pitting (CTV-SP)
  - Une souche moyenne
- Le symptôme le plus foudroyant est le “ Quick Decline “ ou la mort rapide de l'arbre qui affecte les orangers, les mandariniers et les pomelos greffés sur bigaradier.

- Le Stem-Pitting est le symptôme cortical typique de la Tristeza, il se présente sous forme de cannelures plus au moins régulières qui correspondent à des dépérissements du bois.
- Un ralentissement de la végétation et réduction du rendement des fruits en qualité et quantité.
- Sur les feuilles, la maladie se manifeste par des éclaircissements des nervures accompagnés par un ralentissement de la végétation



**Figure 4 :** Différents symptômes provoqués par *Citrus tristeza* Virus

**a)** Le Quick Decline (Oranger greffé sur bigaradier); **b)** Réduction de la qualité et la taille des fruits; **c)** Stem pitting sur pomelo à Venezuela; **d)** Jaunissement des nervures «Vein Clearing» sur feuilles de limettie (Roistacher, 2010).

Pour la détection du CTV, différentes méthodes de diagnostics sont utilisées. L'indexage biologique à travers l'utilisation de la lime mexicaine «*C. aurantifolia*» comme meilleure plante indicatrice, spécifique pour la Tristeza, les symptômes extériorisés sont l'apparition d'un éclaircissement des nervures qui deviennent liégeuses suivi d'un jaunissement et d'un enroulement des feuilles vers le haut (coupe), nanisme, et stem pitting (Roistacher, 1991).

Le diagnostic au laboratoire est assuré par les techniques sérologiques : à savoir par Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay «ELISA» (Roistacher, 1991) ou par le test d'immuno-empreintes Direct Tissue Blot Immuni Assay «DTBIA» qui est une méthode de diagnostic fiable et rapide. Ces techniques sont couramment utilisées dans les programmes de dépistage à grande échelle (Garnsey *et al.*, 1993; Djelouah *et al.*, 2002).

Plusieurs méthodes de diagnostics moléculaires simples et sensibles basées sur la détection spécifique de l'ARN viral ont été mises au point pour détecter le CTV telles que les techniques d'hybridation moléculaire (Barbarossa et Savino, 2006). La RT-PCR «Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction» et la PCR en temps réel «Q-PCR, Real-Time Polymerase Chain» (Loconsole *et al.*, 2010). La RT-PCR technique très spécifique a été utilisée pour détecter le virus dans les plants infectés ainsi que dans son propre puceron vecteur (Rodríguez *et al.*, 2005; Cambra *et al.*, 2006 )

## **II.2. Psorose écaïlleuse «*Citrus psorosis Virus* : CPsV»**

La psorose est l'une des plus importantes maladies transmissible par greffage affectant les agrumes et la plus largement répandue dans les vergers agrumicoles à travers le monde. Cette maladie est communément connue sous le nom de «scaly bark» écorce écaïlleuse suite aux symptômes typiques qu'elle provoque sur les arbres infectés. Elle a été décrite par Fawcett en 1933 (Praloran, 1971).

Fawcett (1938) a aussi démontré pour la première fois sa transmissibilité en greffant des bourgeons infectés sur des arbres sains. Originaire de l'orient, cette maladie fut rapidement disséminée à travers le monde par la diffusion de matériel végétal contaminé, dans les pays où le programme de certification est absent ainsi qu'en présence d'une forte dissémination naturelle (Roistacher *et al.*, 2000).

Différents types de psorose ont été décrits par Roistacher en 1993, la Psorose-A est la plus répandue, elle est caractérisée par des lésions au niveau du tronc et des branches ainsi qu'une coloration rougeâtre interne du bois (Figure 5a). Quant à la Psorose-B, cette forme est rare mais plus sévère car elle se manifeste par la formation des écaïllements d'écorce (Figure 5b), une décoloration irrégulière du limbe avec une formation d'un liseré décoloré et parfois par la formation de taches annulaires sur les fruits des arbres âgés de 10 à 15 ans. La psorose peut demeurer asymptomatique dans la majorité des agrumes «l'oranger, le mandarinier, le pamplemoussier, le pomélo, le tangelo ou le citronnier», ce phénomène explique sa large propagation dans les échanges de matériel végétal de multiplication infecté (Roistacher, 1991).



**Figure 5 :** Symptômes de psorose sur arbre infecté

- a) Coloration rougeâtre interne du bois; b) Ecaillage de l'écorce; c) Taches annulaires sur fruits (Roistacher, 2010).

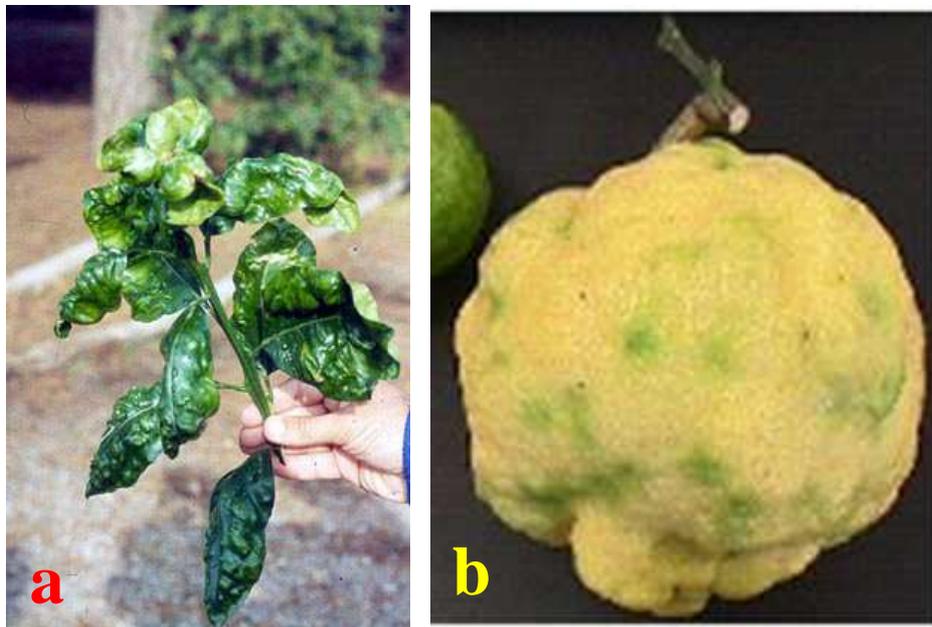
Le *Citrus psorosis* Virus (CPsV) est l'agent responsable de la psorose écailleuse sur différentes variétés de *Citrus* (Milne *et al.*, 2000). Cette maladie est transmissible par greffage mais sa transmission par le champignon *Olpidium* spp a été rapportée récemment (Miao *et al.*, 2005). Ce virus ne se transmet pas par le pollen (Navarro *et al.*, 1980) ni par les semences infectées (D'Onghia *et al.*, 2000 b).

Le dépistage de la maladie se fait par l'indexage biologique par l'utilisation des indicateurs de type oranger tel que «madame vinous» (Roistacher , 1991) ainsi que par des tests de laboratoire, l'immuno-microscopie (Derrick *et al.*, 1993), ELISA (Garcia *et al.*, 1997; D' Onghia *et al.*, 1998 ; Djelouah *et al.*, 2002) , DTBIA (D'Onghia *et al.*, 2001), hybridation moléculaire (Loconsole *et al.*, 2006) , RT-PCR (Djelouah *et al.*, 2000 ; Martin *et al.*, 2004) et RT-PCR en temps réel (Loconsole *et al.*, 2010).

### **II.3. Panachure infectieuse «*Citrus infectious variegation virus* : CIVV»**

La panachure infectieuse, grave infection virale causée par *Citrus Infectious Variegation Virus* (CIVV) appartient au groupe des *ilarvirus*. Cette maladie a été signalée dans de nombreux vergers agrumicoles du bassin méditerranéen (Roistacher, 1991). Selon Praloran (1971), le CIVV est le premier virus des agrumes à avoir été purifié par Grant et Corbet (1964) et transmet mécaniquement de *Citrus* à *Citrus* ainsi qu'à des hôtes herbacés (Trabut, 1913).

Les orangers et mandariniers sont les espèces les plus souvent infectées par cette maladie mais les infections peuvent être plus sévères sur les citronniers et les cédratiers. La panachure infectieuse se transmet très bien par voie mécanique, la transmission par vecteur n'a pas encore été démontrée bien qu'on ait observé un faible taux de transmission par la graine (Roistacher, 1991). Outre le gaufrage (Figure 6a), la panachure infectieuse se manifeste par une déformation des feuilles qui prennent un aspect lancéolé qui s'accompagne parfois par des difformités des fruits ou des bosses qui les rendent impropres à la commercialisation (Figure 6b).



**Figure 6** : Symptômes associés à la panachure infectieuse sur agrumes **a)** Gaufrage prononcé du limbe d'un oranger navel ; **b)** Difformité d'un fruit de cotonnier (Davino *et al.*, 1988).

Le CIVV peut être détecté aussi bien par l'indexage ou le greffage d'inoculation sur des indicateurs ligneux de *Citrus* ainsi que par la transmission mécanique sur *Vigna sinensis* (Roistacher, 1988). Davino et Garnsey (1984) ont purifié une souche faible de CIVV et ils ont mis au point un antisérum pour la détection de différents isolats de CIVV par ELISA and DTBIA (D'Onghia *et al.*, 2001; Loconsole *et al.*, 2006).

Plusieurs tests moléculaires «PCR, RT-PCR» sont utilisés pour la détection et l'identification du virus. Aussi la PCR en temps réel est appliquée pour le dépistage du virus (Loconsole *et al.*, 2010).

#### **II.4. Maladies à Oak leaf pattern «Feuille de chêne»**

La concavité gommeuse, cristacortis et impietratura sont trois infections à virus similaires, largement répandues dans le bassin méditerranéen, et dont l'agent causal n'est pas encore identifié mais transmissible par greffage. Ces maladies se caractérisent par le développement d'un symptôme typique au printemps qui consiste en la formation de nouvelles feuilles avec une mosaïque caractéristique en feuille de chêne. Ces maladies sont détectées uniquement par l'indexage biologique en utilisant l'indicateur ligneux Dweet tangor (*C. reticulata* X *C. sinensis*) (Roistacher, 1991).

##### **II.4.1. La concavité gommeuse.**

La concavité gommeuse est une maladie très répandue dans la région méditerranéenne. Elle affecte l'oranger, le mandarinier, le tangor et tangelo. Pourtant de nombreux cultivars d'agrumes peuvent héberger le pathogène, tout en demeurant asymptomatiques. La maladie se transmet facilement lors du greffage, mais elle peut aussi être transmise naturellement par greffage de racines sur des arbres voisins. Les symptômes se manifestent par le développement de la feuille de chêne autour de la nervure médiane et une coloration interne du bois au niveau du tronc ainsi que de la gommose sur les branches (Figure 7) (Roistacher, 1991).



**Figure 7 :** Symptômes caractéristiques de la concavité gommeuse

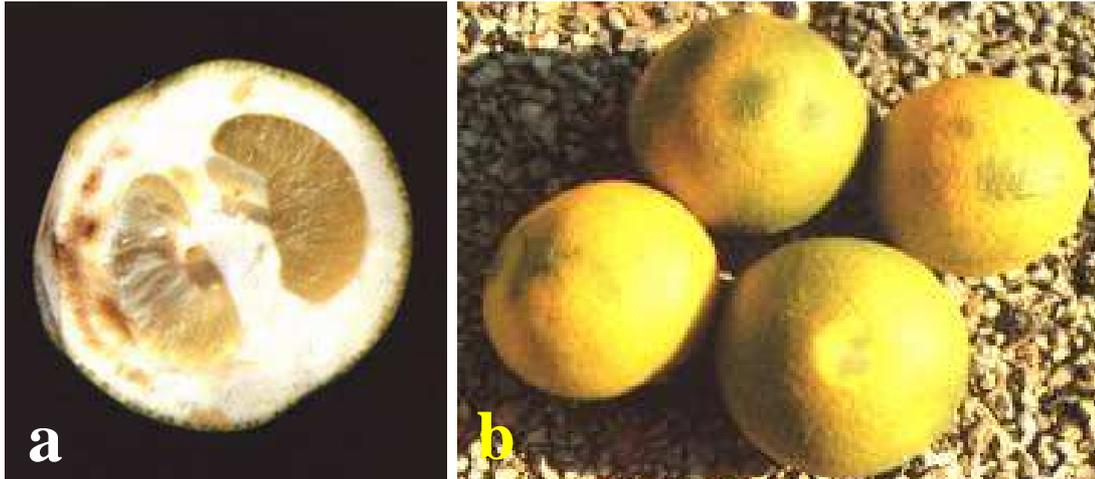
**a)** Symptôme de la feuille de chêne ; **b)** Des anneaux concentriques de gomme, sur un rameau **c)** Des concavités profondes sur tronc (Roistacher, 2010)

#### **II.4.2. Impietratura**

Impietratura a été observé pour la première fois en Palestine (Reichert et Hellinger, 1930) et décrite par Ruggieri en 1955. La maladie a été rencontrée dans la plupart des régions méditerranéennes.

Elle se caractérise par la présence des taches (Figure 8b) et des poches de gomme dans l'albédo des fruits (Figure 8a). Certains présentent extérieurement des bosses en relief qui sont durs au toucher d'où le nom d'impietratura (consistance de pierre) (Figure 8) (Praloron, 1971).

La maladie provoque une chute prématurée des fruits ainsi qu'une diminution de leur taille. Une diminution de la vigueur de l'arbre avec un feuillage légèrement fané a été également rapportée. La maladie est non transmissible par graine ou par vecteur. Les greffons infectés restent toujours le mode de contamination par excellence (Roistacher, 1991).



**Figure 8** : Symptômes d'impetratura sur fruits

**a)** Poches de gomme dans l'albédo des fruits; **b)** Taches sur fruits (Roistacher, 2010).

#### **II.4.3. Cristacortis**

Le cristacortis, maladie transmissible par greffage est observée dans plusieurs pays du bassin méditerranéen. Elle affecte un grand nombre d'espèces d'agrumes particulièrement le tangelo, le bigaradier, l'oranger et le mandarinier. Les symptômes de cette maladie se caractérisent par la formation de dépressions plus ou moins profondes (Figure 9) visibles sous l'écorce au niveau du tronc et des branches. Des imprégnations gommeuses sont observées également dans le fond des trous du bois (Praloron, 1971; Roistacher, 1991).



**Figure 9** : Symptôme de cristacortis sur mandarinier greffé sur bigaradier (Roistacher, 1991).

## **II.5. Les viroïdes des agrumes**

Six différentes espèces de viroïdes ont été signalées à ce jour chez les agrumes en fonction de leur homologie de séquence à des sondes spécifiques, de leur spectre d'hôtes et des symptômes engendrés sur cédratier et enfin de la séquence de leur ARN. En plus du viroïde de la cachexie HSVd-c qui a une taille intermédiaire, on trouve deux espèces du genre apscaviroid: *Citrus bent leaf viroid* CBLVd (ou CVd-I) et CVd-III. Une troisième espèce a été décrite en 2001 et appelée *Citrus viroid* OS CVd-OS. Une autre espèce de Pospiviroid: *Citrus exocortis* Viroid (CEVd) avec une espèce du genre Cocadviroid : CVd-IV ont aussi été signalé (Vernière, 2003).

### **II.5.1. L'exocortis (*Citrus exocortis* Viroid CEVd)**

Le viroïde de l'exocortis des agrumes (CEVd) est un viroïde bien caractérisé de la famille des Pospiviroidae, largement répandu dans l'ensemble des zones productrices d'agrumes à travers le monde. Le symptôme typique sur champ induit par le viroïde (CEVd) se caractérise par une sévère exfoliation de l'écorce sur le porte-greffe trifoliolate «*Poncirus trifoliata*» (Figure 10) ou Rangpur lime «*Citrus limonia*» accompagné par différents degrés de rabougrissement de l'arbre, les branches peuvent montrer des taches jaunâtres «Stem blotching» (Semancik, 1988; Fawcett et Klotz, 1984).

Le *Citrus exocortis* Viroïd (CEVd) est une molécule d'ARN de faible poids moléculaire d'environ 371 nucléotides transmissibles mécaniquement d'un arbre à un autre par les outils de taille ainsi que par le biais d'un greffon infecté.



**Figure 10 :** Symptômes d'exfoliation d'écorce induits par *Citrus exocortis* Viroïd (CEVd) sur Trifoliata (Roistacher, 1991).

### **II.5.2. La cachexie (*Citrus cachexia* Viroid. CCaVd)**

Xyloporose ou Cachexia (*Citrus cachexia* Viroid), est une maladie à viroïde très répandue dans les vergers agrumicoles du monde. Le viroïde de la cachexie induit des réactions de gommose sur les variétés et les porte-greffes de mandarinier et hybrides de mandarinier au champ (Figure 11). Les symptômes sont encore plus intenses sur les tangelos et les tangors. En outre, le *Citrus macrophylla*, les limes acides, les limes douces et l'espèce *Fortunella* sont également infectées. La majorité des espèces commerciales sont asymptomatiques tels que l'oranger, le pomelo, le citronnier, le pamplemoussier, le bigaradier, l'oranger trifolié et les hybrides trifoliés (Roistacher 1991). La transmission du viroïde est assurée par l'emploi des greffons infectés et mécaniquement par l'utilisation des outils de taille contaminés (Brlansky et Timmer, 2012).



**Figure 11** : Symptômes de Cachexie induit par CCaVd

Production intense de gommose sur le tronc de mandarinier Parson's special  
(Roistacher, 1991)

### **II.5.3. Détection de CEVd et CCaVd.**

L'indexage biologique est l'une des méthodes la plus commune utilisée dans la détection des viroïdes, notamment les viroïdes de l'exocortis et de la cachexie (Roistacher, 1991). Ces viroïdes sont détectés par l'inoculation de deux plantes indicatrices, le Cédratier etrog 861-SI sur qui les symptômes se manifestent par une épïnastie des jeunes feuilles une fois inoculées par CEVd (Roistacher *et al.*, 1977). Le CCaVd induit l'exsudation de gomme au-dessus de la ligne de greffe du mandarinier Parson's special (Roistacher *et al.*, 1973).

La détection peut être effectuée par l'analyse de l'acide nucléique des viroïdes extraits des plantes infectées par l'électrophorèse, l'hybridation moléculaire et RT-PCR (Owens et Diener, 1981 ; Flores, 1988; Sano *et al.*, 1988 ; Yang *et al.*, 1992). Cependant l'électrophorèse séquentielle en gel de polyacrylamide (sPAGE) du cédratier inoculé, s'avère très fiable et la meilleure alternative aux méthodes conventionnelles basées uniquement sur l'indexage biologique (Duran-Vila *et al.*, 1993).

Les viroïdes peuvent être détectés par la RT-PCR multiplexe (Wang *et al.*, 2009) et récemment par Transcriptase inverse PCR en temps réel (Rizza *et al.*, 2008).

### **II.6. Stubborn des agrumes «*Spiroplasma citri*»**

Le stubborn est une grave maladie infectant les agrumes principalement l'oranger doux et le pamplemoussier des régions chaudes, de l'Amérique du Nord, l'Afrique, l'Asie et les pays méditerranéens (Bové, 1995). Cette maladie est causée par le *Spiroplasma citri*, mollicute phytopathogène qui se multiplie exclusivement dans les tubes criblés du phloème (Oldfield, 1988).

Le spiroplasma se distingue des autres mollicutes par sa morphologie hélicoïdale et sa motilité (Cole *et al.*, 1973). *S. citri* depuis 1973, a été le premier mollicute, issu de plante, à avoir été cultivé, caractérisé et nommé spiroplasma (Bové et Garnier, 1997), il a été obtenu en culture pure à partir d'orangers malades, dans un milieu riche, complétement en sérum animal, inspiré par des milieux de culture utilisés pour les mycoplasmes animaux (Saglio *et al.*, 1971).

Il est transmis par des insectes hémiptères piqueurs-suceurs, selon le mode persistant circulant et multipliant (Labroussaa, 2008). Les deux principaux vecteurs sont *Circulifer tenellus* présent dans le Sud-ouest des Etats-Unis et le pourtour méditerranéen (Figure 12) alors que l'aire de répartition de *Circulifer haematoceps* est restreinte au pourtour méditerranéen (Breton, 2009).



**Figure 12 :** La cicadelle *Circulifer haematoceps* (Labroussaa, 2010).

La maladie ne tue pas les arbres, mais arrête la croissance et empêche la production de fruits. Les symptômes caractéristiques du stubborn sont la réduction des entre-nœuds donnant à l'arbre un aspect buissonnant, les feuilles sont de petites tailles et en forme de cuillère. Les fruits sont déformés et les pépins avortés ou nécrosés (Figure 13 a b c) (Roistacher, 1991; Yokomi *et al.*, 2008). Une inversion de la coloration est également observée au cours de la maturation des fruits: la couleur orange apparaît du côté pédonculaire et non pas stylaire (Breton, 2009).

*S. citri* peut être détecté par inoculation de plantes indicatrices, particulièrement l'oranger Madame Vinous (Roistacher, 1991), par culture *in vitro* et des tests ELISA afin de détecter et identifier *S. citri* et ce dans des extraits de plantes ou d'insectes infectés (Saglio *et al.*, 1971; Saillard et Bové, 1983). Des techniques moléculaires (Hybridation moléculaire, avec des sondes d'ADN et PCR (Bové, 1995). L'utilisation des amorces PCR pour la détection des séquences de gène de la spiraline, protéine immunodominante majoritaire de la membrane et sa séquence est très conservée dans toutes les souches de spiroplasma (Bové *et al.*, 1993; Foissac *et al.*, 1996; Yokomi *et al.*, 2008). La PCR en temps réel est hautement sensible et spécifique, elle demande moins de temps que d'autres analyses PCR et permet une détermination quantitative de *S citri* (Yokomi *et al.*, 2008).



**Figure 13** : Symptômes de stubborn

a) Fruits déformé ; c) Pépins avortés et nécrosés ; d) Petites feuilles en forme de cuillère (Roistacher, 2010).

## II.7. Le greening des agrumes ou Huanglongbing «HLB»

Le dragon jaune est le nom original de cette maladie d'origine chinoise également appelée greening ou, plus récemment, huanglongbing (Imbert, 2008). C'est une des maladies infectieuses les plus destructives des agrumes. D'origine bactérienne, infectant la majorité des espèces d'agrumes du genre *Citrus*, ses symptômes les plus accentués sont observés sur oranger «*C. sinensis*», mandarinier «*C. reticulata*» et tangelo (*C. reticulata* X *C. paradisi*). Le greening a détruit des millions d'arbres d'agrumes en Asie et en Afrique du sud, la zone méditerranéenne est indemne de cette maladie (Bové, 2006).

La maladie est causée par une bactérie fastidieuse du genre *Candidatus liberibacter*, limitée au phloème, Gram-négative non cultivable (Garnier *et al.*, 1976). Il en existe deux formes: une forme thermotolérante *Candidatus liberibacter asiaticum* (asiatique) et une thermosensible *Candidatus liberibacter africanum* (africaine). Jagoueix *et al.* (1994) ont récemment proposé le genre *Liberobacter* pour l'agent pathogène du greening, le considérant comme un membre de la subdivision alpha des Proteobacteria sur la base d'études de PCR.

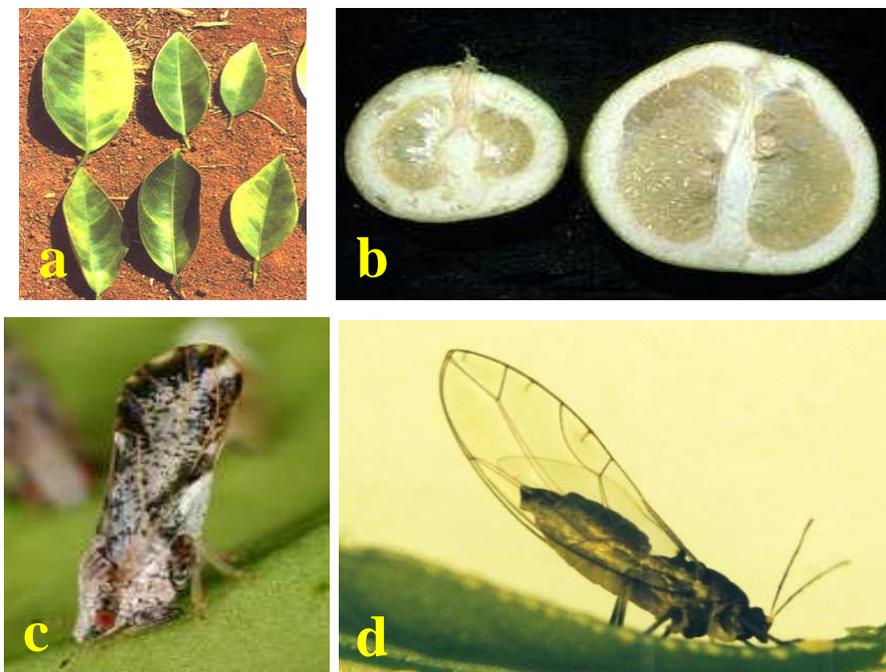
Les noms *L. asiaticum* et *L. africanum* ont été proposés pour les deux formes qui peuvent être séparées en espèces distinctes sur la base de d'homologie de séquences d'acides nucléiques (Planet *et al.*, 1995). Récemment il y a l'apparition de la forme américaine *Candidatus liberibacter americanus*. A longue distance le greening est disséminé par le matériel végétal infecté (greffons, arbres greffés, porte-greffe) venant de zones infestées.

La maladie est transmise potentiellement par deux espèces de la famille des *Psyllidae*:

*Triosa erythrae* (Figure 14d), vecteur de la forme africaine et *Diaphorina citri* (Figure 14c), vecteur des deux autres formes (Bové, 2006).

Les symptômes du HLB sur feuillage se manifestent par des marbrures ressemblant à ceux d'une carence en zinc, un nanisme qui diminue la densité des feuilles et qui entraîne la mort de certaines branches. La production décline progressivement, les fruits sont déformés et asymétriques. La partie du fruit exposée au soleil développe une coloration normale, tandis que des zones du côté ombragé demeurent vertes (Figure 14) (Da Graça et Korsten, 2004 ; Bové, 2006)

La maladie peut être détectée par inoculation de deux plantes indicatrices: le tangelo Orlando et l'oranger. Les plants suspects sont analysés en microscopie électronique pour confirmer la présence de bactéries. L'identification sérologique est effectuée avec des anticorps monoclonaux spécifiques, immunofluorescence et ELISA (Garnier *et al.* , 1987). Des sondes d'ADN qui détectent le pathogène et différencient les deux formes ont été récemment obtenues (Villechanoux *et al.*, 1992). L'hybridation moléculaire en dot blot, et PCR sont très utilisées (Garnier et Bové, 1996 ; Villechanoux *et al.*, 1992 ; Jagoueix *et al.*, 1996).



**Figure 14 :** Symptômes du greening.

**a)** Marbrures sur feuilles ; **b)** A gauche fruit de pamplemoussier atteint du greening à droite fruit sain ; **c)** *Diaphorina citri* ; **d)** *Trioza erythrae*

## **II.8. Situation phytosanitaire des agrumes en Algérie**

Un des facteurs du déclin de l'agrumiculture en Algérie, les maladies virales et du type viral causent des dégâts considérables dans les vergers d'agrumes depuis plus de 40 ans, suivis par d'autres maladies telles que la gombose à phytophthora, l'anthracnose et le 'mal secco' dont l'importance économique est moindre (Tableau II) (Bové, 1995). Ce même auteur a rapporté l'existence de différents symptômes, associés à la Psorose écaillée et la Panachure infectieuse au niveau des vergers d'Alger, Blida et Chlef.

En 1967, Bové a signalé la présence des symptômes de la Tristeza sur certains arbres de citronnier 'Mayer' et mandarinier Satsuma appartenant à la collection des agrumes de la station expérimentale de l'ITAFV (Larbi *et al.*, 2009). Cependant, la maladie n'a pas pu être disséminée naturellement en absence de son vecteur efficace le puceron *Aphis gossypii* (Taleb, 1974). Les symptômes du CTV furent observés par Bové en 1982 sur deux arbres de la collection des agrumes de l'ITAFV, ces deux cas ont été confirmés par l'indexage biologique. Jusqu'à 2000, aucun symptôme de la Tristeza n'a été signalé dans le verger algérien (ITAF, 2003).

En 2001, l'ITAFV signale la présence du CTV dans 11 arbres de mandarinier et d'oranger appartenant aux plants mères maintenus au niveau de la station de Beni Tamou (Larbi *et al.*, 2009). Les sujets positifs ont été détruits et des mesures strictes ont été prises par les institutions techniques nationales ainsi que des mesures préventives très vigoureuses dans les champs (ITAF, 2003; EPPO, 2003).

En absence des vecteurs potentiels de la Tristeza, en l'occurrence *Toxoptera citucidus*, les risques de la dissémination de la maladie furent réduits, voire éliminés en Algérie. Malgré ces mesures, le danger de la Tristeza demeure présent et constitue une vraie menace principalement dans les vergers commerciaux ou les prospections pour la détection du CTV n'ont jamais été effectuées (Larbi *et al.*, 2009).

**Tableau II:** Problèmes phytosanitaires des agrumes en Algérie

Pathogènes	Maladie		Références
	Virus et Virus similaires		
CVV	Panachure des agrumes	X	(Bové, 1995)
CiLRV	Rugosité des feuilles des agrumes	X	(Bové, 1995)
CPsV	Psorose	X	(ITAF, report 1979) (Bové, 1995)
SDV	Nanisme des Satsumas	O	
CTLV	Tatter leaf des agrumes	O	
CTV	Tristeza	X	(ITAF, report 2001) (Bové, 1995)
CVEV	<i>Citrus</i> Vein enation. "virus"	O	
	Concavite gommeuse	X	(ITAF, report 1979) (Bové, 1995)
	Cristacortis.	X	(ITAF, report 1982) (Bové, 1995)
	Impietratura	O	
CEVd	Exocortis	X	(ITAF, report 1980) (Bové, 1995)
CCaVd	Cachexie	X	(ITAF, report 1985) (Bové, 1995)
CVds	Autres viroides des agrumes	O	
	<i>Citrus chlorotic dwarf</i> virus	O	
	Gummy bark	X	(Bové, 1995)
<b>Procaryotes du phloème</b>			
<i>S. citri</i>	Le Stubborn	X	(ITAF, report 1985) (Bové, 1995)
	Broom phytoplasma "Witches broom"	O	

X : Signalé en Algérie    O: Non signalé

Source : Kerboua *et al.* (2001).

## Chapitre III : Les techniques d'assainissement des agrumes

L'une des contraintes majeures de l'agrumiculture est le problème phytosanitaire, particulièrement celui causé par les agents de maladies de dégénérescences transmissibles par greffage. L'utilisation d'un matériel végétal de multiplication sain est l'unique méthode de lutte contre ces maladies. Dans ce contexte, les plants d'agrumes font l'objet d'une certification afin de garantir leur indemnité des principales maladies: la bonne qualité des plants est un facteur déterminant de la future plantation. Toutes les méthodes d'assainissements disponibles et utilisées représentent certains avantages et inconvénients au niveau de l'assainissement des plants infectés ainsi que pour l'efficacité de leurs applications.

Plusieurs méthodes d'assainissement sont utilisées pour les agrumes comme la thermothérapie, la culture du nucelle et le microgreffage. Ce dernier est appliqué dans tous les laboratoires d'assainissement du monde. Cependant, toutes ces techniques présentent des inconvénients et avantages dans l'efficacité de leurs applications à cause de la longue période nécessaire pour l'assainissement des génotypes infectés, du pourcentage du taux d'assainissement spécifiquement pour certains virus, de la difficulté dans l'élimination des infections mixtes et l'étalement du stade de juvénilité.

Récemment une nouvelle technique d'assainissement (l'embryogenèse somatique à partir de stigmate et style *in vitro*) a été mise au point pour la régénération des plants d'agrumes et l'obtention d'un matériel sain, génétiquement identique à la plante mère. Cette technique s'avère très efficace dans l'élimination des maladies de dégénérescence telles que la Tristeza, la Psorose et les viroïdes.

### III.1. L'embryogenèse nucellaire

Depuis des siècles jusqu'à nos jours, le semis de la graine compte parmi les méthodes conventionnelles pour la reproduction des plants d'agrumes. Au niveau des tissus intra-ovulaire, en particulier la nucelle, sont fournis des embryons apoméiotiques appelés aussi embryons nucellaires. Ce type d'embryogenèse est très développé dans la famille des Rutacées, spécialement chez les *Citrus* (Tisserat *et al.*, 1979; Vardi *et al.*, 1990).

Plusieurs jeunes plants nucellaires similaires au plant-mère sont produits, et très peu ou pas d'hybrides (Nictora, 2001).

Cette caractéristique est fréquente chez la plupart des espèces d'agrumes cultivées et permet d'obtenir des plants indemnes de toutes les maladies (Roistacher, 1977 ; Peña *et al.*, 2007). La particularité de cette technique est le fait que la plupart des pathogènes virus et virus-similaires d'agrumes ne passent pas par les semences (Roistacher, 1991) sauf quelques exceptions avec un taux de transmission très bas (Guerra *et al.*, 2004).

L'inconvénient de la sélection nucellaire est l'étalement de la phase juvénile qui est très longue, la pleine production est tardive, le nombre important d'épines et le mauvais développement des fruits en qualité et en quantité. Ces caractéristiques peuvent persister plusieurs années (Roistacher, 1977 ; Peña *et al.*, 2007). Ainsi les plantes nucellaires ne sont pas toujours conformes aux plantes mères « des variants » (Peña *et al.*, 2007).

### **III.2. La thermothérapie.**

La thermothérapie est l'une des principales et anciennes méthodes utilisées pour la production d'un matériel de propagation d'espèces pérennes, indemnes de mycoplasmes, virus, virus similaires et viroïdes (Mink *et al.*, 1998). Navarro *et al.* (1993) rapportent que cette technique est effective dans la réduction de la réplication virale et l'activation des cellules méristématiques et l'obtention des apex sains.

De nombreux agents pathogènes affectant les agrumes sont éliminés tels que le CTV «Tristeza», CPsV «Psorose» et d'autres agents de maladies de type viral comme l'impetratura (Roistacher et Calvan, 1972).

L'assainissement par la thermothérapie est considéré depuis des siècles comme un des moyens écologique et biologique le plus efficacement utilisé dans l'éradication des pathogènes à partir de matériel végétal de propagation (Roistacher, 1995). Elle est aussi utilisée dans la production des plants conformes aux plants d'origines sans l'induction de la phase juvénile (Calvan *et al.*, 1972).

Le traitement à l'air chaud à 35-42 °C pendant 78-107 jours précédé par un pré-conditionnement des plants, a permis d'éliminer avec succès le CTV et le CPSV (Grant, 1967). Cependant, le traitement à l'air humide est très efficace dans l'éradication de la bactérie agent de huanglongbing (greening) à partir des tissus d'agrumes infectés (Lin et Lo, 1965).

Récemment, la thermothérapie est combinée avec la technique de micro-greffage d'apex *in vitro*. Plusieurs pathogènes sont éliminés par la combinaison de ces deux techniques particulièrement les agents dont l'élimination est difficile par le traitement à la chaleur uniquement tel que le CPsV. Ce dernier a été éliminé en combinant la thermothérapie avec le microgreffage en utilisant des apex obtenus *in vitro* à 32°C pendant 2 semaines (Navarro *et al.*, 1993).

Cavalho *et al.* (2002) ont démontré que la thermothérapie *in vivo* à 38°C pendant 2 mois combinée avec le micro greffage est efficace à 100% dans l'élimination de certains virus. Malheureusement, cette technique s'est révélée inefficace dans l'élimination de certains pathogènes thermorésistants comme *Cachexia-xyloporosis* Viroid, *Citrus exocortis* Viroid, et *Spiroplasma citri* (Mink *et al.*, 1998).

### III.3. Le micro-greffage d'apex *in vitro*

Avant 1975, l'embryonie nucellaire était la seule méthode utilisée pour éradiquer les viroïdes, les virus et d'autres agents pathogènes transmissibles à partir de clones infectés (Roistacher, 1995). Cependant, cette technique est limitée par l'étalement du stade juvénile et la production des plants souvent non conformes aux plants d'origine (Nauer *et al.*, 1983). Aussi la thermothérapie est inefficace dans l'irradiation des agents thermorésistants.

Malgré les nombreuses tentatives menées dans les différents laboratoires de culture *in vitro* à travers le monde, la culture de méristème chez les agrumes est restée peu efficiente (Murashige et Skoog, 1962). Actuellement, la maîtrise de la technique semble être acquise grâce aux travaux de recherches entreprises par Murashige et ses collaborateurs qui furent les pionniers à avoir l'idée d'insérer un apex végétatif de quelques millimètres sur l'extrémité d'un semis obtenu *in vitro* (Murashige *et al.*, 1972).

Les paramètres du microgreffage ont été déterminés et améliorés par la suite par Navarro *et al.* (1975) et grâce à ces performances enregistrées, la majeure partie des maladies de dégénérescence ont été éliminées du matériel de multiplication. Même certains problèmes classiques tels que les incompatibilités greffons/porte-greffes, la réactivation du méristème et d'enracinement des microboutures obtenues chez les ligneux tels que les agrumes ont été résolues (Chatibi *et al.*, 1997).

Cette technique s'avère efficace dans l'élimination de tous les agents pathogènes des agrumes qui n'ont pas été éliminés par la thermothérapie ainsi que les virus, virus similaires

et les bactéries endocellulaires. Ainsi les plants produits sont conformes sans l'apparition des caractères juvéniles (Navarro *et al.*, 1975 ; Navarro, 1981; Navarro, 1988).

Su *et al.* (1984) ont réussi à obtenir 60 % du succès en modifiant la technique du microgreffage par la dissection d'une portion triangulaire de la partie basale du porte-greffe et l'insertion de l'apex à l'intérieur suivi de la réinsertion de la portion découpée.

Takahara *et al.* (1986) ont pu éliminer le CTV après avoir modifié la technique, en greffant dans une coupe en L au sommet du porte-greffe citrange troyen des apex d'environ 0,2 ; 0,4 ; 0,8 et 1,0 mm, prélevés à partir des pousses ayant subi une thérapie au préalable. Les plantules ainsi greffées sont placées directement sous serre. Les taux de survie ont été de 15 % à 40 %.

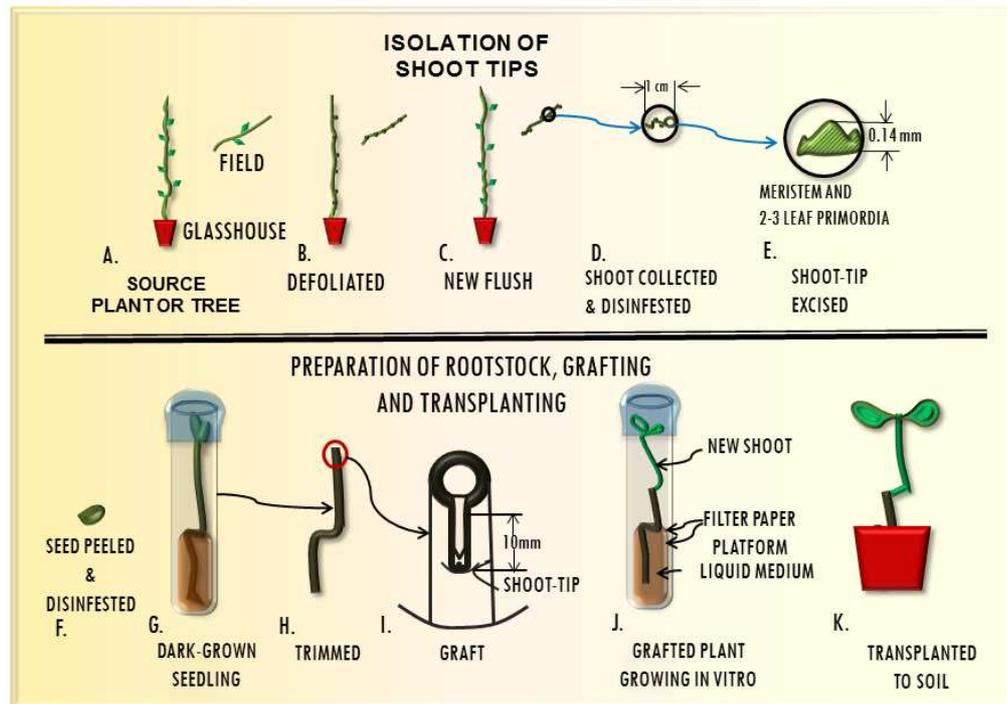
Le chancre bactérien des agrumes, le greening, les souches sévères du virus de la Tristeza, de la psorose écailleuse et Citrus Tater leaf virus ont été éliminés par le microgreffage d'apex (Navarro *et al.*, 1991). Cependant, Fourie (1991) a obtenu 100 % de survie des plants en modifiant l'étape qui suit l'insertion de l'apex étape améliorée par Navarro *et al.* (1975).

Actuellement, la technique du microgreffage est pratiquée dans tous les laboratoires d'assainissement des agrumes pour éliminer les virus et viroïdes nuisibles à partir des germoplasmes (Krueger *et al.*, 2003) ce qui garantit la sûreté de leur introduction et conservation (Navarro *et al.*, 1984 ; 1991). Effectivement, cette technique est utilisée dans la production d'un matériel végétal de propagation sain dans de nombreux pays comme l'Espagne, la France, l'Italie, la Grèce, Chypre, la Turquie, Israël, le Maroc, l'Afrique du Sud, l'Argentine, le Brésil, la Colombie, l'Uruguay, le Chili, le Venezuela, Cuba, le Mexique et les États-Unis (Navarro, 2000).

Navarro (1993) a rapporté que le taux d'assainissement devient très élevé en combinant le microgreffage avec la thérapie pour l'élimination des pathogènes dont l'éradication s'avère inefficace avec le micro greffage uniquement. Entre 32°C et 35°C de thérapie, la réplication des virus est ralentie et l'activité des cellules méristématiques est accélérée, cette combinaison permet l'obtention des pousses végétatives indemnes (Navarro *et al.*, 1980). Navarro (1993) a éliminé le CPsV en combinant la thérapie avec le microgreffage en utilisant des apex obtenus *in vitro* à 32°C pendant 2 semaines. Cavalho *et al.* (2002) ont démontré que la thérapie *in vivo* à 38°C pendant 2 mois combinée avec le microgreffage est efficace à 100% dans l'élimination de certains virus.

### Technique du micro greffage :

Navarro *et al.* (1975) ont défini les paramètres du microgreffage *in vitro* et perfectionné cette méthode selon le diagramme général illustré dans la Figure 15. La technique envisage deux opérations: Préparation du porte -greffe et collecte avec préparation des apex végétatifs.



**Figure 15** : Diagramme général de la procédure du microgreffage (Navarro *et al.*, 1975).

**1) Préparation du porte porte-greffe** : Les graines de *Citrange troyer* sont cultivées sur un milieu gélosé dans l'obscurité totale pendant deux semaines, les plantules obtenues sont retirées du tube à essai. La portion supérieure d'environ 1 cm au-dessus de la racine et la partie basale de l'apex racinaire sont éliminées.

**2) Collecte et préparation des apex végétatifs** : Des pousses d'environ 1 cm de long sont collectées à partir du matériel végétal à assainir, les feuilles de ce dernier sont éliminées au préalable pour forcer la production de jeunes pousses. Après stérilisation, les folioles sont éliminées pour exposer la région méristématique. Sous un microscope binoculaire, les

ébauches foliaires toutes petites sont excisées et un petit apex (environ 0,1 - 0,2 mm) composé d'un méristème et de deux ou trois primordiaux foliaires est prélevé.

L'apex est soigneusement inséré dans une encoche en 'T renversé' réalisée à proximité de l'extrémité coupée du porte-greffe. La jeune plante greffée est cultivée sur un milieu nutritif pendant au moins 5 semaines dans une chambre de culture à 27°C. Le succès du microgreffage varie entre 30% et 50%. Ce pourcentage dépend de la taille de l'explant, l'espèce et variété d'agrumes ainsi que des conditions de culture.

### III.4. L'embryogenèse somatique

#### III.4.1. L'embryogenèse somatique : Historique et application chez les agrumes

L'embryogenèse somatique (du grec *samas* = corps) se produit en absence de toute fécondation ou «méiose et recombinaison de l'ADN». C'est la voie du développement par laquelle des cellules somatiques se développent en structures qui ressemblent aux embryons zygotiques avec les mêmes stades morphologiques classiques (stade globulaire, cœur, torpille et cotylédonaire) et par une série d'étapes embryologiques sans fusion des gamètes (Jiménez, 2001). Les formations obtenues sont appelées embryons somatiques et qui permettent d'obtenir une multitude de plantules identiques génétiquement à la plante donneuse d'explants.

Historiquement le premier embryon somatique a été obtenu pour la première fois par Reinert (1959) par la culture *in vitro* des tissus de *Daucus carotta*. En plus des Ombellifères, la multiplication des plants par l'embryogenèse somatique a été appliquée pour la régénération d'autres familles et différents genres tels qu'*Atropa*, *Ranunculus*, *Citrus*, *Antirrhinum*, *Cucurbita*, *Macleaya*, *Nigella* et *Petunia* (Kkohlenbach, 1977), ainsi que pour la multiplication en masse de diverses plantes médicinales (Tripathi et Tripathi, 2003).

Bien que la technique de culture d'apex soit très pratiquée dans le domaine de la micropropagation *in vitro*, l'un des atouts majeurs de l'embryogenèse somatique est son pouvoir de production des plants en masse en temps très court (Ammirato, 1983) de plantes entières sans passer par les étapes (contraintes) que connaît habituellement l'organogenèse (phase de callogènes et de rhizogenèse) (Ammirato, 1987 ; Jiménez, 2001).

L'embryogenèse somatique est une technique de régénération et d'assainissement très séduisante et puissante qui permet de régénérer un taux très élevé de plants indemnes de maladies (Ollitaul, 1992).

Sagissant de l'intégration de l'embryogenèse somatique dans la multiplication des agrumes, les premiers travaux ont été réalisés en cultivant des ovules fertilisés et / ou des embryons nucellaires isolés à partir des génotypes poly-embryonnés (Litz *et al.*, 1985).

Selon Ricci *et al.* (2002), la régénération des agrumes par la culture des tissus *in vitro* implique l'embryogenèse somatique indirecte. Cette technique est très importante pour la propagation ou l'amélioration génétique des agrumes, la production des semences artificielles, l'élimination des agents pathogènes et la conservation du germoplasme *in vitro* (D'Onghia *et al.*, 2000a ; Germana, 2005).

Différents types d'explants (couches cellulaires minces de style et stigmate ou l'organe entier) sont excisés à partir des tissus floraux des agrumes et capables de régénérer des plants génétiquement identiques aux plants mères (De Pasquale *et al.*, 1994; Carimi *et al.*, 1995).

Effectivement, la technique de régénération des embryons somatiques à partir des tissus floraux des *Citrus* a été décrite pour la première par De Pasquale *et al.* (1994) et elle s'est avérée efficace pour la plupart des génotypes d'agrumes (Tableau III) (Carimi *et al.*, 2001).

**Tableau III** : Génotypes régénérés par embryogenèse somatique à partir de la culture de tissus floraux.

<b>Espèces</b>	<b>Génotypes</b>
<i>C. limon</i>	Femminello, Zagara Bianca, Femminello, Santa Teresa, Lunario, Monachello, Berna, Limone di Massa Pilone, Limone Pera
<i>C. sinensis</i>	Bonanza, Atwood, Navelina, Washingtonnavel, Navelate, Valencia Late, Ugdulena 6Brasiliano NL92, Sanguinello, Tarocco Gianduia, Tarocco Puglia,
<i>C. medica</i>	Cedro di Diamante, Cedro Trabia
<i>C. aurantifolia</i>	Limetta messicana
<i>C. limetta</i>	Limetta romana
<i>C. deliciosa</i>	Avana, Tardivo di Ciaculli
<i>C. myrtifolia</i>	Chinotto Comune
<i>C. madurensis</i>	CNR P9, Scillipoti, Continella
<i>C. paradisi</i>	Marsh Seedless
<i>C. aurantium</i>	Consolei, AA CNR 12, AA CNR 30, AA CNR 31, AA CNR 32
<i>C. tardiva</i>	CNR P6
<i>C. othaitensis</i>	Arancio pinocchio
<i>C. sinensis</i> X <i>C. reticulata</i>	Dweet tangor
<i>C. meyerii</i>	Meyer lemon
<i>Fortunella margarita</i>	Kumquat oval

Source : Carimi *et al.* (2001)

## Chapitre IV : L'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate *in vitro*.

L'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate *in vitro* (Carimi *et al.*, 1995), est une technique de multiplication et d'assainissement récente, très efficace dans l'éradication des pathogènes de la plupart des espèces d'agrumes infectées à l'exception des clémentines. Elle permet de régénérer un nombre important de plants sains à partir de différentes lignées embryonnaires sans l'induction de variation somaclonale (D'Onghia *et al.*, 1997).

D'Onghia *et al.* (2000a) ont rapporté que par l'utilisation de cette technique, plusieurs maladies de dégénérescence affectant les agrumes ont été éradiquées à 100 % telles que la psorose écailleuse, la panachure infectieuse, l'exocortis, la cachexie, la concavité gommeuse l'impetratura et le cristacortis.

Selon Carimi (2005), le pourcentage des explants embryogéniques diffère selon les génotypes et varie entre 0 % et 58 %. Une bonne aptitude à l'embryogenèse somatique a été observée chez *C. limon*, *C. sinensis* et *C. reticulata*. Cependant, d'autres espèces comme le *C. paradisi* «pamplemoussier» et le *Fortunella margarita* «Kumquat» ont montré un potentiel embryogénique faible par rapport à d'autres espèces telles que les «clémentines» *C. othaitensis* et le «pomelo» *C. maxima*. Ces dernières se sont montrées récalcitrantes à ce processus morphogénétique.

La formation de cellules embryogènes ou d'embryons somatiques dépend du choix de l'explant. L'embryogenèse survient plus rapidement dans les cals provenant d'explants juvéniles, tandis que le potentiel embryogénique des explants de fleurs «Style et stigmate» ou de fruits «d'ovules non développés» ne contenant pas de cellules juvéniles diminue considérablement (Carimi, 2005).

L'un des facteurs limitant de l'embryogenèse somatique, particulièrement à partir de différents tissus floraux, est l'explant mis en culture. Selon Meziane (2006), les fleurs comme source d'explants doivent être fraîchement collectées avant leur ouverture et conservées à 4°C pour une période maximale de 20 jours avant leur utilisation.

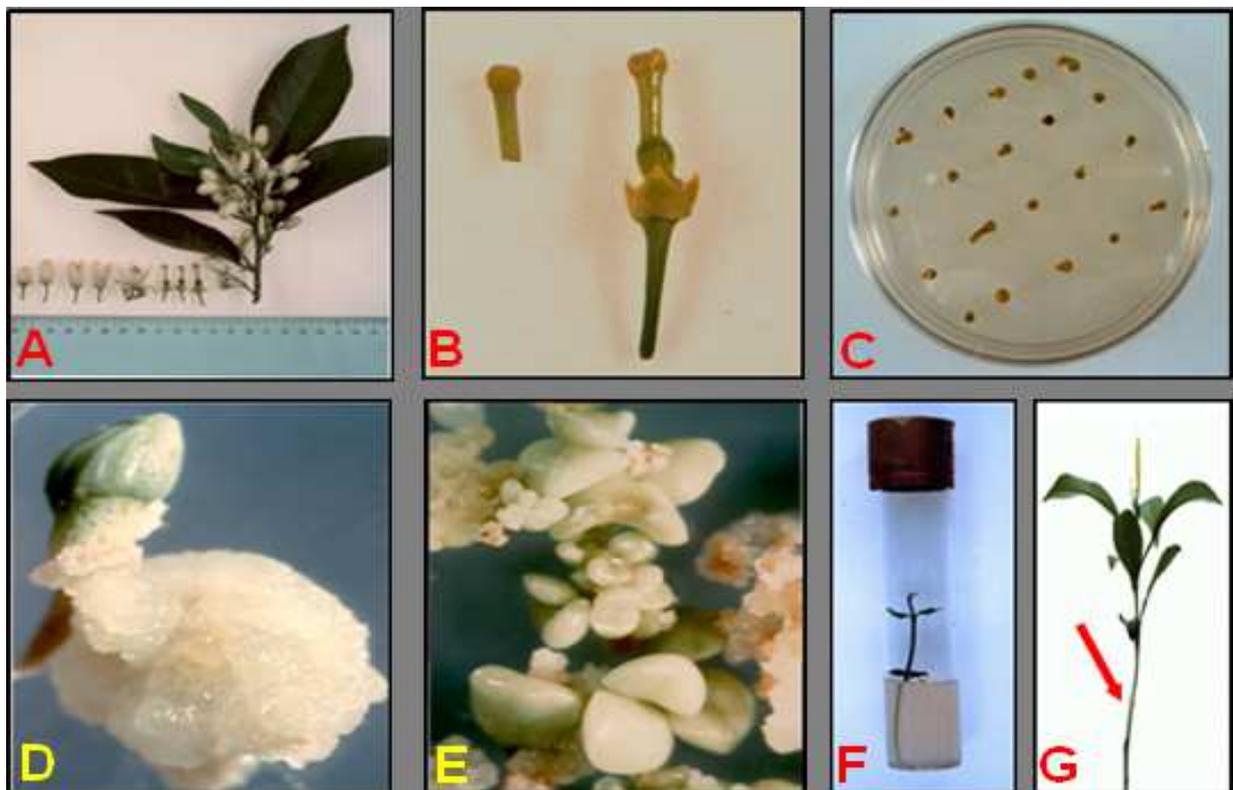
La fidélité génétique des plants régénérés est souvent limitée en raison de leur réversion morphologique à l'état juvénile. D'Onghia *et al.*, (2000a) ont rapporté que les plants d'agrumes régénérés par la culture de style et stigmate *in vitro* expriment plusieurs caractères

des plants issus de semis. Les plants régénérés perdent leurs caractères juvéniles soit après une année de culture en conditions de serre soit après greffage sur un porte-greffe ou d'un écusson de bourgeon sans épines.

Dans ces conditions, la fructification est initiée après 3 années de la culture initiale. Ainsi, les fruits produits par les plants régénérés *in vitro* produisent des fruits identiques à ceux produits par les plants mères.

#### IV.1. Les principales étapes de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate *in vitro*

Le protocole de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate *in vitro* (Figure 16) a été mis au point par Carimi *et al.* (1995).



**Figure 16** :Étapes de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de stigmate et style *in vitro*

**A)** fleurs fermées ; **B)** pistil séparé de l'ovaire ; **C)** mise en culture de style/stigmate ; **D)** formation de cal ; **E)** Formation d'embryons somatiques ; **F)** Germination d'embryon somatique ; **G)** mini-greffage *in vivo* des plantules régénérées pour acclimatation (Carimi, 2003).

Toutes les étapes de la technique, de la mise en culture *in vitro* du pistil jusqu'à la différenciation embryonnaire, la germination d'embryons et la conversion des embryons somatiques en plantules, ont été réalisées dans un environnement hautement stérile sous une hotte à flux laminaire. La phase d'acclimatation des plants régénérés est réalisée par greffage des vitroplants sur *C. aurantium* le «bigaradier» porte-greffe âgé de 4 à 6 mois, selon le protocole décrit par De Pasquale *et al.* (1999).

Cette technique a permis de régénérer des plants d'agrumes sains et génétiquement identiques à la plante mère (D'Onghia *et al.*, 2000a ; De Carimi *et al.*, 1995; Pasquale *et al.*, 1994). C'est une voie de régénération très efficace qui a permis l'éradication de nombreux pathogènes agents de graves maladies de dégénérescence affectant les agrumes tels que le CTV, le CPsV, le CVV et le CEVd (Caruso *et al.*, 2000).

#### **IV.1.1. Milieu de culture**

Selon Duran-Vila *et al.* (1989), habituellement chez les agrumes, la composition des milieux de culture *in vitro* utilisée est à base de macro et microéléments MS (Murashige et skoog, 1962). Ce dernier est caractérisé principalement par une teneur en sels minéraux, en particulier le potassium, et par une concentration élevée en azote (60méq/l sous forme de nitrate et d'ammonium) dont 1/3 apporté sous forme réduite (ions  $\text{NH}_4^+$ ); le rapport nitrate / ammonium est très favorable à l'induction de l'embryogenèse somatique (Del Vesco et Guerra, 2001). L'extrait de malt et le saccharose sont utilisés comme source de carbone.

Le carbone est un élément favorisant l'induction de l'embryogenèse somatique en qualité et quantité (Iraqi *et al.*, 2005 ). Effectivement, Carimi (2003) confirme que les fortes concentrations de saccharose chez les agrumes permettent d'augmenter les chances de formation d'embryons somatiques.

#### **IV.1.2. Conditions de culture**

Tan et Qian (1988) ont rapporté que les conditions environnementales des cultures (température, lumière, atmosphère, etc.) peuvent influencer fortement la prolifération cellulaire au cours de la callogenèse ainsi que l'embryogenèse somatique chez diverses plantes. L'induction de la callogenèse et de l'embryogenèse somatique chez les agrumes est obtenue par le maintien des cultures à une température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  sous une photopériode de 16 heures avec un éclairage de 30 à 60  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{S}^{-1}$  fourni par des tubes fluorescents (Duran-Vila *et al.*, 1992 ; Carimi, 2003).

### IV.1.3. Les régulateurs de croissance

L'auxine est un facteur important pour déclencher le processus conduisant à la formation d'embryons somatiques. Au cours de la première phase de culture, une auxine : l'acide 2-4 dichlorophenoxyacétique (2-4D) est souvent utilisée. D'autres auxines telles l'ANA et l'AIA peuvent être employées. Pendant cette période, les cellules se divisent et en cas d'évolution favorable, on observe des amas globulaires ou amas proembryogènes. Après cette phase d'induction embryonnaire, le transfert des cultures sur un milieu sans auxines permettra le développement des embryons (Boulay, 1993).

Chez la majorité des ligneux, une cytokinine (BAP ou K) est nécessaire au développement des embryons jusqu'au stade cotylédonaire (Féraud- Keller et Espagnac, 1989). Selon Carimi (2001), l'initiation de l'embryogenèse somatique à partir des tissus floraux des agrumes par l'addition des vitamines et l'hormone de croissance la BAP (6-benzylaminopurine 1) est d'une importance fondamentale, cette dernière favorise la croissance des cellules et leur différenciation.

### IV.2. Fidélité génétique des plants d'agrumes régénérés

L'embryogenèse somatique est un outil très précieux qui aboutit à une multiplication conforme (Quashie et Koukou, 2009) en peu d'espace et en un intervalle de temps relativement court par rapport aux techniques classiques de la propagation. Seulement, la culture *in vitro* des tissus végétaux, induit des altérations génotypiques et phénotypiques chez les plants régénérés (Kaepler *et al.*, 1998). De ce fait, on assiste à l'apparition de clones non conformes (morphologiquement et physiologiquement) qu'on désigne sous le terme de vitrovariants (Demarly et Sibi, 1989) ou variants somaclonaux (Larkin et Scowcroft, 1981). Ce phénomène, constitue une véritable limite au développement de la multiplication végétative par l'embryogenèse somatique.

Le terme de variation somaclonale a été évoqué pour la première fois par Larkin et Scowcroft (1981). Ces deux auteurs, lors de la mise au point d'un test de résistance de la canne à sucre à un pathogène, faute de plants sensibles disponibles, utilisèrent des clones régénérés *in vitro* à partir de parents sensibles. Ils constatèrent alors que certains des plants s'avéraient résistants, alors qu'ils n'avaient précédemment pas été en contact avec le pathogène (Beulé, 2006).

De nombreuses études ont été menées mettant en évidence différents types de variations (Larkin et Scowcroft, 1981 ; Karp, 1989; Phillips *et al.*, 1991). Celles-ci est le résultat de l'expression de gènes instables (Buiatti, 1977) d'extinction ou de réactivation de gènes (Siminovitch, 1976) et d'activation de transposons (Peshke *et al.*, 1991).

De nombreuses hypothèses ont été énoncées pour identifier les facteurs responsables de ces variations (Sané, 1998). Dans certains cas, c'est des modifications caryotypiques provoquées par les changements de niveau de ploïdie fréquents chez les végétaux (Mouras et Lutz, 1980). Dans d'autres cas, on assisterait à une dérive progressive des tissus en culture (Meins et Binns, 1977; Besseet *al.*, 1992). Karp (1991) rapporte que les conditions de culture peuvent induire des variations somaclonales

Afin d'évaluer la conformité génétique des plants régénérés, différentes méthodes sont utilisées à savoir la numération chromosomique et cryométrie en flux (quantification de l'ADN nucléaire) (O'Brien *et al.*, 1996).

Pour la caractérisation moléculaire des plants régénérés *in vitro*, plusieurs méthodes sont appliquées à savoir les microsatellites, la technique AFLP (Amplified Fragment techniques moléculaires Length Polymorphism) (Vos *et al.*, 1995), RAPD (Polymorphisme d'amplification aléatoire de l'ADN), RFLP (le polymorphisme de longueur des fragments de restriction) et l'Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) (Martins *et al.*, 2004).

Selon Siragusa *et al.* (2007), de nombreux auteurs ont rapporté que la régénération des plants d'agrumes *via* l'organogénèse et l'embryogenèse aboutit à la production de variants. Chez les mono-embryonnés 29% des plants régénérés par l'embryogenèse somatique à partir de la culture du nucelle, présentent un phénotype anormal, tandis qu'aucune modification phénotypique n'été observée chez les plants régénérés à partir des agrumes polyembryonnés (Navarro *et al.*, 1985).

Aucune modification morphologique ni changement dans le nombre de chromosomes n'ont été observés chez l'ensemble des plants régénérés à partir des plants avec différents âges de *C. acida* Roxb. Calli (Chakravarty et Goswami, 1999).

## Chapitre V : Matériel et Méthodes.

### Introduction

L'embryogenèse somatique est un processus biologique qui aboutit à l'obtention d'un nombre illimité d'embryons à partir d'une cellule ou d'un groupe de cellules somatiques (Jain et Gupta, 2005). C'est une méthode de multiplication végétative qui permet de régénérer à partir d'un seul explant, un grand nombre d'embryons somatiques, lesquels deviendront des plants dont le génotype est identique à la plante mère source (Treblay *et al.*, 2007).

L'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate *in vitro* s'avère une excellente technique pour l'élimination des différents pathogènes affectant la plupart des espèces des genres *Citrus* (D'Onghiaet *al.*, 2000a).

L'Algérie détient une collection variétale d'agrumes composée de 256 variétés/clones, ce qui représente un patrimoine génétique inestimable (Larbi *et al.*, 2009). Cependant, plusieurs maladies dues aux virus et virus similaires affectant les agrumes en Algérie ont été signalées par Bovè (1995).

Les infections induites par *Citrus tristeza Virus* (CTV) sont les plus dangereuses. Ils ont été signalés par Larbi *et al.* (2009) sur le mandarinier et l'oranger, ces derniers sont utilisés comme plants mères et conservés à Beni Tamou (Blida) au niveau de la station de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV).

En plus du CTV, les autres agents de maladies de dégénérescence sont redoutables et constituent une vraie menace. C'est la raison pour laquelle un programme de production des plants sains de différentes espèces d'agrumes a été lancé récemment. La difficulté d'éradication de certains pathogènes, affectant ces spéculations par les techniques conventionnelles, fait de l'embryogenèse somatique à partir de stigmate et style une bonne alternative aux autres techniques d'assainissement.

L'objectif de ce présent travail est l'application de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate pour la régénération et l'assainissement de nombreux génotypes d'agrumes de la collection nationale, maintenue à l'ITAFV, ainsi que l'évaluation du potentiel embryogénique des génotypes autochtones algériens.

Plusieurs travaux publiés et non publiés de Carimi *et al*, (1994) sur l'application de l'embryogenèse somatique sur différentes espèces d'agrumes du genres Citrus ont rapporté l'effet marquant de l'hormone de croissance BAP dans l'induction de la callogenèse et l'embryogenèse somatique.

Suite à l'indisponibilité de boutons floraux fermés fréquemment et au taux important de contaminations lors de la stérilisation du milieu de culture et des explants pendant les premières années de notre étude, l'expérimentation s'est déroulée sans le témoin qui est le milieu MS sans hormone.

Ce présent travail a été réalisé au sein de différents laboratoires selon leurs compétences. L'évaluation de l'état sanitaire des plants mères et des plants régénérés a été effectuée dans le laboratoire de virologie à l'IAM de Bari Italie. Les techniques de culture *in vitro* à savoir toutes les étapes de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate ont été réalisées au niveau du laboratoire des cultures *in vitro* de l'ITAFV Alger, et l'acclimatation a été réalisée au niveau des serres d'acclimatations de l'IAM de Bari.

La dernière partie de cette investigation qui consiste à l'évaluer la conformité génétique des plants d'agrumes régénérés, a été effectuée dans le laboratoire du centre des recherches génétiques de Palerme, Italie.

### V.1. Origine du matériel végétal

Durant la période de pleine floraison et avant l'anthèse, les boutons floraux (Figure 17) de 35 variétés appartenant aux sept espèces d'agrumes des genres *Citrus* (Tableau IV) ont été collectés à partir des vergers de la collection nationale des agrumes détenue par l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV) localisés à Halouiya Commune de Boufarik, Blida et commune de Tessala El Merdja, Alger :

- *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ;
- *C. limon* (L.) Burm ;
- *C. reticulata* Blanco ;
- *C. paradisi* Macfad ;
- *C. reshni* Hort. ex Tan. ;
- *C. jambhiri* Lush;
- *C. maxima* (Burm.) Merrill.



**Figure 17 :** Boutons floraux des différentes espèces d'agrumes

**a)** *C. limon* (L.) ; **b)** *Citrus sinensis* (L.) ; **c)** *C. reticulata* ; **d)** *C. paradisi*.

**Tableau IV :** 35 géotypes des différentes espèces d'agrumes testées par la culture de style/stigmate *in vitro*.

<b>Espèce</b>	<b>Variétés</b>	<b>Espèce</b>	<b>Variétés</b>
<i>C. jambhiri</i>	Rough lemon	<i>C. reshni</i>	Cleopatra mandarin
<i>C. limon</i>	Béni Abbes *	<i>C. reticulata</i>	Mandarine de Blida*
	Bornéo		Mandarine Temple
	Citronnier Palerme		Pam Américain
	Citronnier secile	<i>C. sinensis</i>	Alger navel*
	Dellys*		Djirid*
	Eureka		Double fine améliorée
	Eureka Maroc		Golden Bucky
	Femminello		Maltaise de Tunisie
	Lisbon 16		Oranger de bey*
	Lisbon 6		Oranger de Blida*
Lunario	Oranger sidi Ali*		
Poire de Commandeur	Sanguine de Biskra*		
<i>C. maxima</i>	Pomélo Royal		Shamouti Skikda*
	Pomélo Ruby	Shamouti station *	
<i>C. paradisi</i>	Pamplemoussier à chaire rose	Thomson navel	
	Pamplemoussier commun	Washington navel	
		Metidja Navel*	

\* Géotype autochtone

**V.2. Evaluation de l'état phytosanitaire**

Avant l'application de l'embryogenèse somatique, l'état sanitaire du matériel végétal à savoir, les plants mères (fleurs sources d'explants, feuilles et tissus phloématiques) ont été évalués.

Aussi, toutes les plantes régénérées *in vitro* à partir des génotypes infectés sont testées pour l'estimation de leur taux d'assainissement par l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate.

### V.2.1. L'indexage biologique

Il est réalisé en greffant différents tissus (bourgeons, morceau de feuille ou d'écorce) des plants à tester sur des indicateurs ligneux spécifiques pour chaque maladie (Tableau V). Des symptômes typiques pour chaque pathogène sont extériorisés à différentes températures (Roistacher, 1991).

**Tableau V :** Liste des indicateurs ligneux utilisés pour l'indexage biologique (Roistacher, 1991)

Maladie	Plante indicatrice	Température (°C)
<b>Infectious variegation (CVV)</b>	Cédratieretrog ( <i>C. medica</i> )	
	Volkameriana ( <i>Citrus lemon X Citrus aurantium</i> )	22 à 24
<b>Tristeza (CTV)</b>	Lime mexicaine ( <i>Citrus aurantifolia</i> )	22 à 24
<b>Psorosis (CPsV)</b>	Oranger doux Madame vinous ( <i>C. sinensis</i> )	22 à 24
<b>Cachexia (CCaVd)</b>	Cédratier etrog ( <i>C. medica</i> )	32 à 34
<b>Exocortis (CEVd)</b>	Cédratier etrog ( <i>C. medica</i> )	32 à 34
<b>Stubborn (<i>Spiroplasma citri</i>)</b>	Oranger doux Madame vinous ( <i>C. sinensis</i> )	32 à 34

### V.2.2. Les techniques sérologiques

**a. DAS ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)**

Cette méthode a été utilisée selon le protocole décrit par Djelouah *et al.* (2000) avec l'utilisation d'anticorps polyclonaux spécifiques aux virus de la tristeza (CTV) et de la psorose (CPsV) (Kit commercial, Agritest-Italie) et des tampons appropriés (Annexe 1).

Les extraits des plants ont été obtenus par broyage de tissus phloématiques pour le CTV (0,5 g de nervures foliaires ou pétioles et pistil) dans un tampon d'extraction et de feuilles matures pour le CPsV. La sensibilisation des plaques ELISA a été effectuée par l'utilisation d'anticorps polyclonaux (concentration 1/1000), à raison de 100 µl/puit.

Après une période d'incubation de 2h à 37°C, la plaque a été lavée 3 fois avec un tampon de lavage.

Un échantillon de 100 µl/puit d'extraits de plants à tester a été déposé, puis incubé à 4°C toute la nuit. Les plaques ont subi 3 fois un lavage, puis des anticorps polyclonaux conjugués à la phosphatase alcaline (1/1000) ont été ajoutés. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 2 heures.

Pour la révélation, une solution contenant 1 mg de P-nitrophényl phosphate\1ml de tampon du substrat a été ajoutée à la plaque à raison de 100 µl /puit, et l'incubation a été effectuée à température ambiante pour une durée de 1 h à 2 h. Finalement, la densité optique des échantillons (D.O) a été mesurée à l'aide d'un lecteur ELISA à une longueur d'onde  $\lambda$ : 405 nm.

**b. TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich)**

Cette méthode a été utilisée selon le protocole décrit par Cambra *et al.* (1995), pour la détection du virus de la panachure infectieuse des agrumes (CVV). Dans ce contexte un Kit commercial ELISA produit par l'Unité de Contrôle des Plantes des domaines agricoles au Maroc a été utilisé,

Des anticorps polyclonaux spécifiques au CVV (concentration de 1/1000 ont été utilisés à raison de 100 µl \ puit pour sensibiliser les plaques ELISA. Ces dernières ont été incubées à 37°C pendant 4 h. Après incubation les plaques ont été lavées 3 fois avec un tampon de lavage (Annexe 1).

Les extraits des plants ont été obtenus par broyage de tissus foliaires dans un tampon d'extraction (Annexe 1) puis 100 µl ont été déposés dans chaque puits des plaques ELISA et incubés à 4°C pendant toute la nuit.

Après une série de trois lavages, des anticorps monoclonaux (dilution 1/1000 dans le tampon de conjugaison) ont été ajoutés à la plaque (100 µl \ puit) et incubés à 37°C pendant 4h.

Le second anticorps anti-IgG extrait à partir de souris (1\1000) couplées à la phosphatase alcaline a été ajouté et la plaque ELISA a été incubée à 37°C pendant 4 heures. Finalement, 100 µl d'une solution contenant 1 mg de P-nitrophényl phosphate\ 1ml de tampon du substrat ont été ajoutés dans chaque puit des plaques ELISA. La lecture de la plaque a été effectuée toutes les 30 minutes par un lecteur ELISA, à une densité optique à 405 nm.

### **V.2.3. Les techniques moléculaires**

#### **V.2.3.1. Détection des viroïdes**

##### **Test RT-PCR**

Ce test a été utilisé pour la détection moléculaire des viroïdes des agrumes. Les échantillons à tester ont été collectés en plein champ, puis inoculés sur cédratier etrog et diagnostiqués par Multiplex RT-PCR selon le protocole décrit par Wang *et al.*, (2009)

##### ***Extraction des acides nucléiques***

Un échantillon de 5-10 mg de tissus foliaires a été trituré par l'utilisation de l'azote liquide, puis broyé avec un pilon en plastique stérile (BioRad) et transféré dans des tubes eppendorf de 1,5 ml, et homogénéisé avec 60 µl de tampon TES (100 mM Tris - HCl, 2 mM EDTA et 2% (p/v) SDS) et 60 µl d'une solution composée d'eau saturée de phénol/ chloroforme/isoamyl-alcool (25:24:1 v/v/v) .Les échantillons homogénéisés ont été incubés dans un bain Marie à 70 °C pendant 5-10 min, suivie d'une centrifugation à 12.000 g pendant 5 min.

Pendant ce temps, une ouverture a été réalisée avec une aiguille de calibre 25 sur le fond d'un tube eppendorf de 0,5 ml. Cette dernière a été fermée en utilisant une petite quantité de billes de verre (425 µm -600, Sigma) dans le tampon TNE (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA). Cette mini-colonne a été ensuite remplie par une suspension de Sephadex G-50-80 (Amersham Biosciences) équilibrée au préalable avec du tampon TNE- à l'intérieur d'un tube de 2,2 ml et centrifugé à 5.000 g pendant 3 min. La mini-colonne a ensuite été placée dans un tube eppendorf stérile de 1,5 ml et 40 µl de la phase aqueuse de l'extrait obtenu a été transférée dans la matrice et le culot a été éliminé.

Enfin, la mini-colonne a été centrifugée à 5000 g pendant 4 min pour récupérer la solution éluée (environ 20 à 80 µl). Les acides nucléiques totaux extraits ont été directement utilisés pour la RT-PCR ou conservés à -20 ° C.

### *Synthèse de l'ADN complémentaire et la réaction en chaîne par polymérase*

Les amplifications ont été réalisées dans un volume total de 10 µl, utilisant le système SuperScript one step RT-PCR avec un kit PlatinumTaq ADN polymérase (Invitrogen). La réaction a été effectuée avec une mixture de toutes les paires d'amorces spécifiques aux viroïdes à détecter (Tableau), à une concentration finale de 0,2 µM à l'exception des amorces CEVd (0,5 M) et HSVd (0,1 µM).

Le protocole one step RT PCR consistait en une réaction incluant 1 µl d'acide nucléique total et 9 µl de la mixture RT-PCR contenant: 5 µl de tampon 2X, 0,4 µl 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,25 µl de 10 mM dNTPs 0,4 µl 100 mM; DTT 2 µl cocktail d'amorces, 0,4 µl de RT-Taq, 0,55 µl d'eau stérile. Par contre les conditions idéales pour la multiplex RT PCR consistait en une incubation initiale à 50 °C pendant 30 min pour la synthèse d'ADNc, suivie de dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min., suivi de 35 cycles de 94 °C pendant 30s, l'hybridation des amorces à 58 °C pendant 30s et l'extension d'amorces à 68 °C pendant 45 s, suivie d'une extension finale à 68 °C pendant 7 min.

**Tableau VI :** Liste des amorces de la multiplex RT-PCR.

R: amorce antisense, F: amorce sense,

Amorces	Séquence 5'-3'	(Paire de bases)
CEV-R	CCGGGGATCCCTGAAGGACTT	371
CEV-F	GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG	
HSVd-R	CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT	302
HSVd-F	GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC	

### V.2.3.2. Détection du *Spiroplasma citri*

#### Test PCR

Cette technique a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques désignées sur la séquence du gène P58 « putative adhésion multigène », et du gène de la spiraline, suivant le protocole décrit par (Foissac *et al.*, 1996 ; Yokomi *et al.*, 2008).

#### Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été effectuée par l'utilisation du bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) selon le protocole décrit par Doyle et Doyle (1990).

Une quantité de 300-500 mg des tissus de columelle de fruit, a été broyé et homogénéisé dans des sacs d'extraction Bioreba contenant 1:10 m/v de tampon d'extraction CTAB), successivement et 2 ml du broyat ont été transférés dans des tubes eppendorf ; puis les échantillons ont été chauffés à 65° C pendant 30 minutes, suivie d'une centrifugation à 10000 rpm pendant 5 minutes.

Après centrifugation, 1 ml de solution obtenue a été transféré dans un nouveau tube eppendorf de 2 ml, en évitant de transférer les débris de tissus végétaux, ensuite 1 ml de chloroforme alcool isoamylique 24:1 a été ajouté et bien mélangé par agitation.

Une autre centrifugation a été effectuée à 13000 rpm pendant 10 minutes. Une quantité de 750µl de surnageant a été prélevé et transféré dans un microtube de 1,5 ml et 450µl (environ 0,6 V) d'isopropanol froid a été ajouté, puis mélangé 2 fois par inversion et incubé à -20 °C pendant 30 à 60 minutes pour la suspension.

Après l'incubation, les tubes ont été centrifugés à 13000 rpm pendant 10 mn et le surnageant a été décanté. Les culots ont été lavés avec 1 ml d'éthanol à 70% et centrifugé à 13000 g pendant 10 min, puis séchés à l'air libre et remis en suspension dans 100 µl de tampon TE, la concentration finale en acides nucléiques a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre.

#### PCR Conventionnelle

Les analyses PCR ont été effectuées en utilisant différentes paires d'amorces (Tableau VII). la première paire d'amorces utilisés pour la détection de *S. citri*, a été conçue sur un gène codant la protéine majeure du *spiroplasma citri* : la spiraline (Foissac *et al.*, 1996). Par contre

la seconde paire d'amorces P89 a été conçue sur le gène codant une protéine putative d'adhésion, présente en copies multiples sur les plasmides pSci1-5 et impliquée dans le mécanisme d'adhésion du *S. citri* aux cellules de l'insecte (Yokomi *et al.*, 2008) ; ceci permettant de confirmer la présence du *S. citri* en cas d'infection afin de surmonter les limitations des amorces spiralin pour la détection de *S. citri*. C'est l'outil le plus efficace pour la détection de *S. citri* sur le terrain.

**Tableau VII:** Paires d'amorces utilisées pour la PCR.

Amorce	séquence (5' to 3')	Gène cible	Référence
<b>Spiralin-f</b>	GTCGGAACAACATCAGTGGT	Spiralin	(Foissac <i>et al.</i> , 1996)
<b>Spiralin-r</b>	TGCTTTTGGTGGTGCTAATG		
<b>P89-f</b>	ATTGACTCAACAAACGGGATAA	Gène Putatif d'adhérence	(Yokomi <i>et al.</i> , 2008)
<b>P89-r</b>	CGGCGTTTGTTTGTTAATTTTGG		

Le protocole de PCR incluait une réaction composée de 1,5 µl d'acide nucléique total dans 20 µl de la mixture PCR contenant, le tampon 1X DreamTaq, 0,4 µl de chacun des dNTPs (Sigma) 10 mM, 10 µM des amorces sens et antisens et 0.1 µl de DreamTaq polymérase. Les réactions ont été réalisées dans un thermocycleur comme suit : dénaturation à 95°C pendant 5 min, suivi de 40 cycles de 95 °C pendant 30s, l'hybridation des amorces à (54-56°C) pendant 30s et l'extension d'amorces à 72 °C pendant 90 s, suivie d'une extension finale à 72 °C pendant 5 min.

Les produits amplifiés par PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% colorés avec du bromure d'éthidium. L'identification des bandes a été déterminée par comparaison avec les produits obtenus avec le témoin positif et à l'aide d'un marqueur moléculaire de 100pb (Promega).

L'électrophorèse a été effectuée dans le tampon TAE 1X à 100 volts pendant 40 min. Les profils de bandes ont été observés sous UV après coloration au bromure d'éthidium.

### V.3. Technique de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate

#### V.3.1 Préparation du milieu de culture.

Style et stigmate sont ensemencés sur un milieu de base MS (4,3g/l) (Murashige et Skoog, 1962) enrichi par des vitamines (Sigma 1000X 1ml/l), saccharose (50g/l) source de carbone, (0,5 g/l) d'extrait de malt composant ayant un effet positif sur le développement des agrumes *in vitro* (Beloualy,1991) (8g/l) d'Agar pour solidifier le milieu et une hormone de croissance BAP (6-benzylaminopurine ) (3mg/l) qui est ajoutée avant autoclavage du milieu.

Avant stérilisation dans l'autoclave, le pH du milieu est ajusté à  $5,7 \pm 0.1$  et par la suite mis à l'autoclave à une température de  $121^{\circ}$  C pendant 20 min sous une pression de 2 bar. Ainsi stérilisé, le milieu est écoulé dans des boîtes de Pétri (100 mm /Ø) à raison de 20ml/ boîte, ensuite scellées par du Parafilm M et conservées dans le laboratoire à température ambiante.

#### V.3.2 Préparation de l'explant

Dans des conditions hautement stériles et sous une hotte à flux laminaire, les explants sont préparés et mis en culture selon les étapes suivantes (Carimi *et al.*, 1999)

##### a. Stérilisation des fleurs

Les fleurs utilisées pour l'embryogenèse somatique ont été collectées avant leur ouverture afin d'éviter l'introduction des solutions stérilisantes à l'intérieur durant l'étape de la stérilisation. Une partie des fleurs a été utilisée directement par la culture de stigmate et style, l'autre partie a été conservée à  $4^{\circ}$ C dans des boîtes de Pétri stériles scellées avec du Parafilm M pour une période de 2 à 3 jours en attendant leurs utilisations.

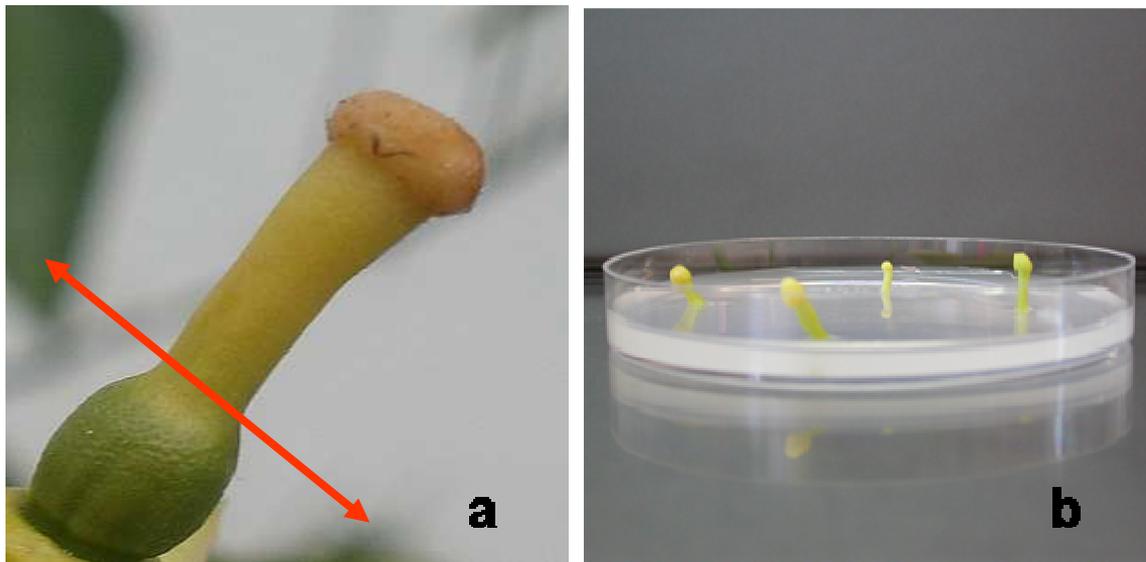
Sous une hotte à flux laminaire, les fleurs sont stérilisées par immersion durant 5mn dans une solution d'éthanol (70% v/v d'eau). Après trois rinçages (3mn) avec de l'eau distillée stérile, les fleurs sont traitées pendant 20mn avec une solution d'hypochlorite de sodium (20% v/v d'eau) et rincées par la suite pendant 5 mn avec de l'eau distillée stérile.

En fin de stérilisation, les fleurs sont étalées pour séchage sur un papier buvard stérile pour une période de 10 à 15 mn.

**b. La mise en culture de stigmate et style**

Dans des conditions aseptiques, stigmate et style sont mises en culture *in vitro* selon le procédé suivant :

- Les fleurs sont ouvertes à l'aide d'une pince et scalpel stériles.
- Stigmate et style sont séparés de l'ovaire par une coupe longitudinale à l'axe perpendiculaire (Figure 17a).
- Le stigmate et style sont placés verticalement dans des boîtes de pétri, la surface de la coupe en contact avec le milieu de culture. Ce contact de l'explant avec l'hormone de croissance incorporée dans milieu est nécessaire. Cinq explants sont placés dans chaque boîte de Pétri (100x 15mm) (Figure 17 b). Six répétitions sont effectuées pour chaque boîte de pétri\génotype.
- Les cultures sont placées dans une chambre de culture à une température de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  avec une photopériode de 16 heures.



**Figure 18:**La mise en culture du style et stigmate *in vitro*

**a)** Stigmate et style séparés de l'ovaire ; **b)** Culture de stigmate et style

**c. Subcultures**

Selon le protocole décrit par Carimi en 2005, périodiquement après 4 - 6 semaines de la culture initiale, des subcultures de cals sont effectuées dans des milieux de la même composition décrite ci-dessus. Dans le cas de la formation d'embryons somatiques, ces derniers sont transférés dans un milieu de culture sans l'hormone BAP.

### **V.3.3. Régénération de plantules**

Après germination des embryons somatiques, ces derniers sont transférés dans des tubes à essai contenant 20 ml de milieu sans hormone à raison d'un embryon/tube. Les tubes avec plantules régénérées sont transférés pour incubation dans une chambre de culture à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  avec une photopériode de 16 heures pour une période de 2 à 3 mois. Période durant laquelle les plantules régénérées atteignent 5 à 7 cm de long (Carimi, 2005).

### **V.3.4. Acclimatation**

Après 2 mois d'incubation dans des tubes à essai, les plantules régénérées sont retirées des tubes à essai et minigreffés sur des portes-greffes de *Citrangle troyer* âgés de 3 à 4 mois.

Après greffage, les plantules sont recouvertes par des sacs en polyéthylène pour le maintien de l'humidité et favoriser la réussite du greffage, par la soudure du greffon au porte-greffe.

Les plantules ainsi greffées sont transférées sous serre vitrée à  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  pour acclimatation. Un mois après la réussite du greffage, les sacs en polyéthylène sont retirés pour permettre aux plantes de continuer leur développement.

### **5.3.5. Diagnostic phytosanitaire des plantules régénérées**

L'ensemble des embryons et plantules régénérées sont testés par les différentes techniques de diagnostics (sérologique, moléculaire et biologique) utilisées pour les plants mères source d'explants afin d'évaluer leur état sanitaire ainsi que leur niveau d'assainissement par la technique d'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate.

### 5.3.6. Analyse des résultats

Les explants (stigmate\style) des 5 espèces d'agrumes avec les différents génotypes ont été suivis régulièrement afin d'évaluer la période d'induction de la callogénèse et la formation des premiers embryons somatiques.

Un dispositif expérimental aléatoire a été réalisé. Chaque boîte de Pétri contient 5 explants\ génotype et 6 répétitions ont été retenues pour chaque boîte à savoir 30 explants pour chaque génotype.

L'effet génotypique a été évalué par une analyse de la variance (ANOVA) avec une probabilité de ( $p= 0,01$ ).

## V.3. Evaluation de la conformité génétique des plants d'agrumes régénérés

Afin d'analyser la variabilité génétique des plants régénérés, une technique basée sur l'ADN à savoir des marqueurs de type "empreintes génétiques" ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) a été utilisée pour détecter le polymorphisme chez les différents génotypes régénérés.

L'ADN total a été extraite des jeunes feuilles collectées à partir de pieds mères cultivés en plein champ (pour la plante mère/clones primaires) et de plantules régénérées *in vitro* par l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate. Les plantes mères et une quinzaine de régénérants, obtenus à partir de différents cals embryogènes, ont été sélectionnés pour l'évaluation de la stabilité génétique (la conformité génétique). Des plantules de deux espèces avec différents génotypes ont été analysées à savoir *le C. limon* (Dellys, Bornéo, Beni Abbés) et le *C. sinensis* (Washington Navel, Metidja Navel).

### V.3.1. Extraction de l'ADN génomique

Les échantillons foliaires ont été surgelés avec de l'Azote liquide ( $N_2$ ) et conservés à  $-80^\circ C$  jusqu'à l'analyse. Les tissus végétaux ont été broyés dans des mortiers stériles et l'ADN génomique a été extraite suivant le protocole CTAB décrit par Doyle et Doyle (1990).

La concentration en ADN cible obtenue à partir de chaque échantillon a été quantifiée moyennant la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde  $\lambda$ : 260 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Sambrook *et al.*, 1989). Par la suite, la qualité de l'ADN extraite a été évaluée par une électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

### V.3.2. Protocole d'extraction de l'ADN totale

L'extraction de l'ADN totale a été effectuée à l'aide du tampon CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) (Annexe 2) selon la méthode décrite par Doyle et Doyle (1990). Un volume de 800 µl du tampon CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2% mercaptoethanol) a été chauffé à 60°C, additionné au broyat de feuilles et mélangé vigoureusement à l'aide d'un vortex. Le mélange a été ensuite incubé à 60°C pendant 20 min.

### V.3.3. Purification de l'ADN

Les protéines ont été éliminées à l'aide d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (24: 25: 1). Par centrifugation à 15000 tr/min pendant 5 à 10 minutes, la séparation entre la phase organique et celle aqueuse contenant l'ADN s'est réalisée.

Afin de faire la précipitation de l'ADN, la phase aqueuse a été additionnée d'un volume égal d'isopropanol froid. Par la suite, le mélange a été placé dans la glace pendant 20 min, puis centrifugé à 15000 tr/min pendant 8 min.

Le culot d'ADN a été lavé avec de l'éthanol à 80% et séché au speed-vaccum. L'ADN purifiée est alors diluée dans 50-100 µl d'eau ou du tampon TE (10 mM de Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). La pureté de l'ADN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. La migration a été faite durant 40 min dans un tampon TBE (Tris 2 M, Acétate de sodium 1 M et EDTA 50 mM pH 8.0) dilué au 1/50ème. Le gel a été coloré avec du Bromure d'Ethidium (BET) et visualisé par des rayons UV.

### V.3.4. L'empreintes digitales ISSR

Une douzaine d'amorces a été employée pour l'amplification de l'ADN (Tableau VIII) (Fang et Roose, 1997). Dans un volume total de 25 µl, la réaction PCR a été composée d'un cocktail de 20 mM Tris HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 800 µM dNTPs, 0.5 µM de chaque amorce (sens et anti-sens), 1 U Taq polymérase (Invitrogen, Life Technologies), avec 20 ng d'ADN.

L'amplification génique par PCR a été effectuée grâce à un thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems), en utilisant une paire d'amorces spécifiques (Fang et Roose, 1997) selon le programme suivant : une séparation initiale de l'ADN double brins à 94°C pendant 5 min, suivie de 36 cycles d'amplification comportant

une dénaturation à 94°C pendant 30 s, une hybridation à 47-52°C pendant 45 s et une extension à 72°C pendant 120 s. Une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 min a été également adoptée.

De chaque amplification, 25 µl de produits d'amplification ont été ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % pendant 5h à 110 volts, contenant du 1X BET (45 mM Tris–borate, 1 mM EDTA) et 0.5 µg/ml de solution aqueuse de bromure d'éthidium. Les bandes d'ADN sont visualisées et photographiées sous des rayons d'UV. La reproductibilité des profils d'ADN a été confirmée en répétant les amplifications par PCR 3 fois.

**Tableau VIII:** Amorces utilisées pour l'évaluation de la conformité génétique.

Nom	Séquence	T <sub>a</sub> (°C)
ENEA34	(ACC) <sub>6</sub> CC	56
ENEA36	CCA(TGA) <sub>5</sub> TG	56
ISSR1-6	(CA) <sub>8</sub> RG	49
ISSR2+2b	(AC) <sub>8</sub> YG	53
ISSR3+3b	(AG) <sub>8</sub> YC	49
ISSR4+4b	(AC) <sub>8</sub> YA	49
ISSR5+5b	(AC) <sub>8</sub> YT	49
ISSR7-9	(AG) <sub>8</sub> YT	49
ISSR8+8b	(GT) <sub>8</sub> YG	56
ISSR10+10b	(TCC) <sub>5</sub> RY	56
ISSR11+11b	(GA) <sub>8</sub> YC	56
ISSR12+12b	GA) <sub>8</sub> YT,	49

### **5.3.5. Analyse des résultats**

Lors de l'analyse moléculaire, seules les bandes représentant des signaux d'amplification commune dans l'intervalle de 200 pb à 2,6 kb ont été considérées, tandis que les bandes de faible poids moléculaire ont été exclues.

Afin d'évaluer le polymorphisme génétique, les marqueurs ISSR ont été désignés par (1) pour la présence et (0) pour l'absence de bandes. Tous les échantillons amplifiés par PCR et provenant des plantules régénérées dans les mêmes conditions de culture ont été déposés pour migrer sur le même gel, et confrontés aux produits PCR de la plante mère correspondante pour leur comparer.

Indépendamment de la fréquence des allèles, le pourcentage de polymorphisme (P) a été calculé selon la formule ci-dessous :

$$\mathbf{P = \text{nombre de loci polymorphes} / \text{nombre total de loci}}$$

Toutefois, en vue de confirmer le polymorphisme obtenu, l'analyse PCR a été répétée et l'ADN des plantules polymorphes a été extraite et testée plusieurs fois.

## Chapitre VI : Résultats et discussion

### VI.1. L'état phytosanitaire du matériel végétal utilisé

#### VI.1.1. L'indexage biologique

L'ensemble des géotypes sources d'explants «stigmaté» utilisés pour l'embryogenèse somatique a été testé à travers l'utilisation des indicateurs ligneux qui ont révélé la présence des agents pathogènes transmissibles par greffage tels que les virus et virus similaires, viroïdes et autres.

Des symptômes spécifiques à l'agent recherché ont été extériorisés à des différentes températures telles que rapporté et décrit par Roistacher (1991) (Figure17). Les résultats de l'indexage biologique sont récapitulés dans tableau en annexe 2.

Cependant, certains indicateurs n'ont pas extériorisé des symptômes suite à l'échec de l'inoculation et dans certains cas à la détérioration de quelques échantillons destinés à l'analyse lors du transport d'Alger vers Bari en Italie.



**Figure 19** : Symptômes observés sur les différents indicateurs inoculés

- a) Eclaircissement des nervures de la lime mexicaine (*CTV*) ; b) Feuille de chêne de Madame Vinous (*CPsV*) ; c) Retarde de croissance et épinastie des jeunes feuilles de Cédratier etrog (*CEVd*) ; d) Décoloration et retard de croissance des feuilles de Madame Vinous (*Spiroplasma citri*); e) Décoloration et déformation des feuilles de Volkameriana (*CVV*).

## VI.1.2. Techniques sérologique «ELISA»

### VI.1.2.1. Détection des virus

Plusieurs génotypes ont réagi positivement aux tests DAS-ELISA (CTV, CPsV) et TAS-ELISA (CVV). Les résultats obtenus ont été confirmés par l'indexage biologique des échantillons collectés à partir des plants indicateurs inoculés. Plusieurs infections mixtes avec dominance virale ont été détectées dans la plupart des génotypes (Tableau IX).

**Tableau IX:** État sanitaire des plants mères source d'explants (Style\stigmaté) analysées par le test ELISA.

Espèce	Génotypes	Virus	Espèce	Génotypes	Virus
<i>C. maxima</i> (Burm.) Merrill	Pomélo Ruby	CPsV	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Alger navel	CTV, CPsV,
	Béni Abbes	CPsV		Double fine améliorée	CTV, CPsV
	Bornéo C.Palermo	CVV CVV		Maltaise de Tunisie Oranger de Blida	CTV CTV,
<i>C. limon</i> (L.) Burm.	Dellys	CTV		Shamouti Skikda	CTV, CPsV,
	Eureka	CVV		Shamouti station	CTV, CPsV,
	Eureka	CVV		Thomson navel	CPsV
	Maroc			Washington navel	CTV, CPsV, CVV
				Metidja navel	CVV, CTV,

## VI.1.3. Les techniques moléculaires

### VI.1.3.1. Détection des viroïdes

Pour la détection des principaux viroïdes des agrumes, les 35 génotypes ont été testés par Multiplex RT-PCR, sur les 3 plus importants viroïdes des agrumes (CEVd, CCaVd, CVd III).

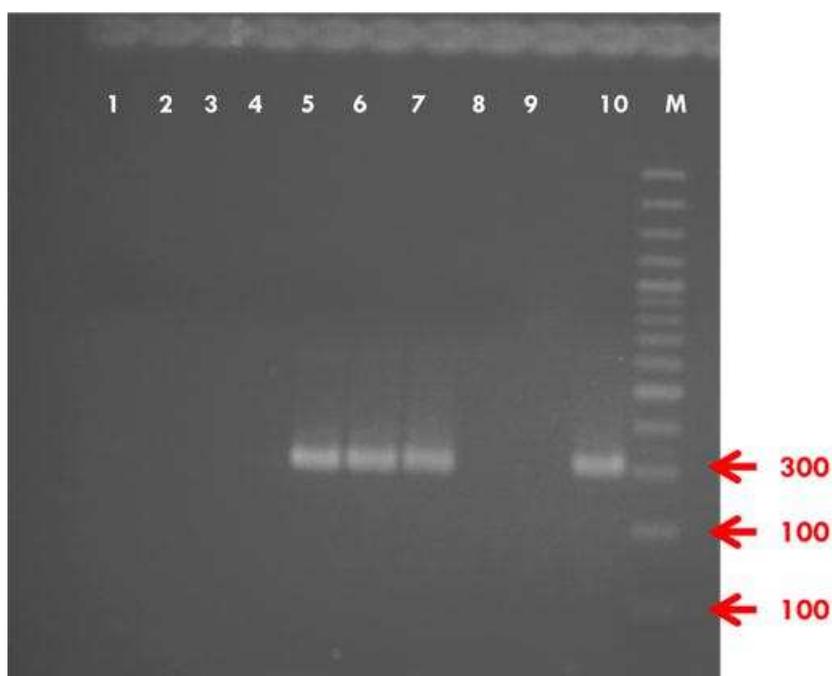
Le matériel végétal utilisé a été prélevé à partir de cédratiers Etrog inoculés par des plants mère et maintenus à  $34 \pm 1^\circ\text{C}$  pour plus de 45 jours. Un important nombre d'espèces se sont révélés infectés par des viroïdes principalement l'espèce *C. limon* suivie par *C. sinensis*, *C.*

*reticulata* et *C.reshni* respectivement (Tableau X).

Plusieurs viroïdes ont été détectés avec une dominance du *Citrus exocortis* Viroid (CEVd) et Hop stunt viroid (HSVd) (Figure 20 et 21). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les viroïdes sont transmis par greffage et leur dissémination se fait essentiellement par la propagation végétative de matériel infecté ainsi qu'à l'utilisation des outils de coupe et de taille non désinfectés. Ces pratiques culturales sont souvent à l'origine de la forte infection de nos vergers par ces maladies à viroïdes

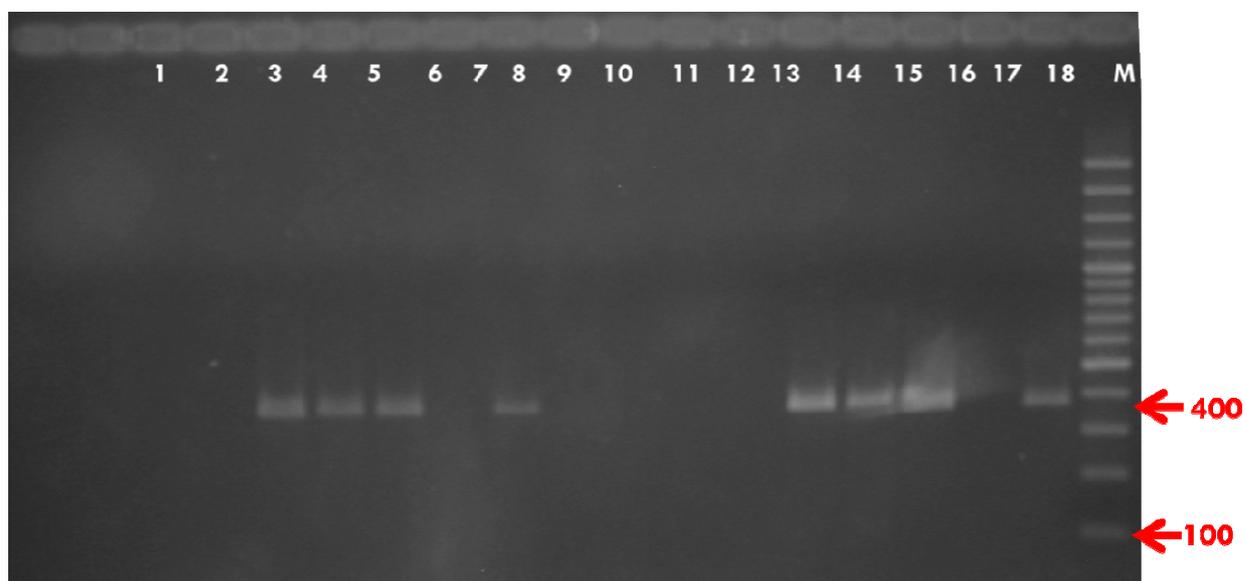
**Tableau X:** Résultats de l'utilisation de RT-PCR pour la détection des viroïdes chez les plants mères source d'explants «Style\stigmat»

Espèce	Génotypes	Viroïdes Infection	Espèce	Génotypes	Viroïdes Infection	
<i>C. limon</i> (L.) <b>Burm.</b>	Béni Abbes	HSVd , CEVd	<i>C.sinensis</i> (L.) <b>Osbeck</b>	Alger navel	CEVd	
				Metidja navel	CEVd	
	Bornéo	CEVd, HSVd		Oranger de bey	CEVd	
	C.Palerm	CEVd		Oranger de Blida	CEVd	
	C.secile	HSVd, CEVd, d'autres viroïdes				
	Dellys	CEVd, HSVd, d'autres viroïdes		Sanguine Biskra	de HSVd, CEVd	
	Eureka	CEVd, HSVd		Shamouti station	CEVd, HSVd, d'autres viroïdes	
	Eureka Maroc	CEVd		<i>C. reshni</i> <b>Hort. ex Tan</b>	Cleopatra mandarin	CEVd
	Femminello	HSVd, CEVd		<i>C. reticulata</i> <b>Blanco</b>	Mandarine de Blida	HSVd
	Lisbon 16	viroïdes			Mandarine Temple	viroïdes
Lisbon 6	viroïdes		Pam Américain	HSVd		
Lunario	HSVd, CEVd, d'autres viroïdes					
Poire de Commandeur	viroïdes					



**Figure 20 :** Electrophorèse sur gel d'agarose des Produits RT-PCR par l'utilisation des amorces spécifiques au HSvd

**M :** Marqueur 100pb (Promega); **1 – 8 :** plants mères testées ; **9 :** Témoin négatif (Eau) ; **10 :** Témoin positif d'un plant symptomatique.

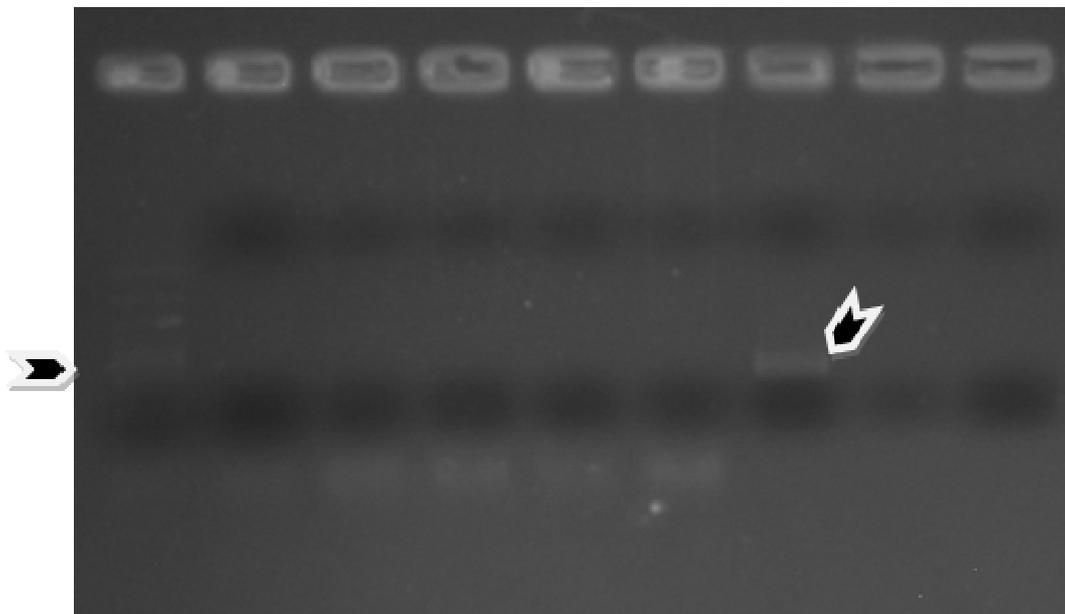


**Figure 21 :** Electrophorèse sur gel d'agarose des Produits RT-PCR par l'utilisation d'amorce spécifique au CEVd

**M** : Marqueur 100pb (Promega) ; **1** : Témoin négatif d'un plant sain ; **2** : Témoin négatif (Eau) ; **3** : Témoin positif d'un plant symptomatique ; **4 – 18** : plants mères testées.

### VI.1.3.2. Détection du *Spiroplasma citri*

L'agent causal du Stubborn (*Spiroplasma citri*) n'a pas été détecté sur les 35 échantillons prélevés des différents génotypes sélectionnés et testés par PCR. Aucun des génotypes des différentes espèces d'agrumes testés n'a mis en évidence une infection par ce pathogène (Figure 22).



**Figure 22:** Profil électrophorétique obtenu sur gel d'agarose 1,2 % d'un test PCR pour la détection du *S. citri* utilisant des amorces spécifiques.

**M** : Marqueur 100pb (Promega) ; **1 – 6** : Plants mères testées ; **7** : Témoin positif d'un plant symptomatique ; **8** : Témoin négatif d'un plant sain ; **9** : Témoin négatif (Eau)

## VI.2. Technique de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate

La mise en culture des tissus végétaux est l'une des étapes les plus difficiles dans les techniques de culture *in vitro* particulièrement chez les espèces ligneuses pérennes, notamment les agrumes (Kuperman, 1984).

Les fleurs de 35 génotypes appartenant aux différentes espèces d'agrumes à savoir *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus limon* (L.) Burm, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus paradisi* Macfad, *Citrus reshni* Hort. ex Tan., *Citrus jambhiri* Lush et *Citrus maxima* (Burm) Merrill ont été utilisés pour la culture de style et stigmate *in vitro*.

Lors de notre investigation, un très grand nombre de fleurs qui dépasse souvent les 600 fleurs par génotypes a été collecté parce que plusieurs d'entre elles ont été écartées lors des premières manipulations (l'étape de la stérilisation et la mise en culture du style et stigmate) pour les raisons suivantes :

- Leur ouverture durant la période de stockage à 4 °C, ce qui induit l'endommagement des explants par les solutions stérilisantes.
- Absence de pistil, phénomène très fréquent chez *C.limon*.
- Présence d'un brunissement à l'intérieur des fleurs particulièrement au niveau du stigmate.
- Un nombre important d'explants a été éliminé, suite à l'apparition des contaminations cryptogamiques et bactériennes, après deux jours de leur mise en culture.

### VI.2.1. L'aptitude à la callogénèse

De nombreux auteurs ont rapporté que la réussite du processus de la callogénèse est liée au type de phytohormones utilisées dans le milieu de culture.

Rahaman *et al.* (1996) ont mis en évidence le rôle de la BAP et de la kinétine sur l'induction de cals pour plusieurs espèces du genre *Citrus*.

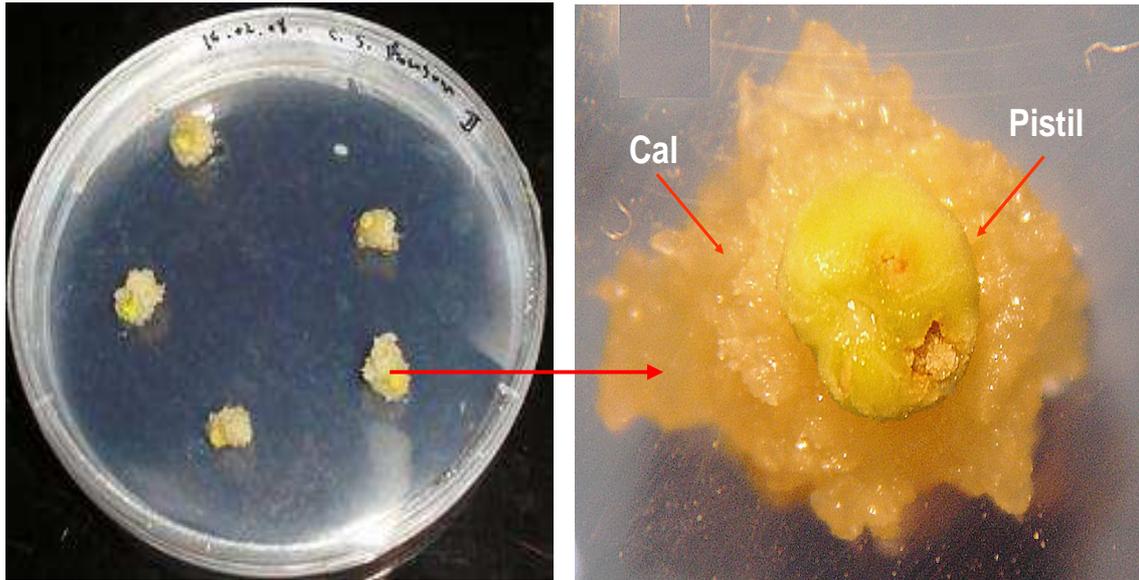
De Pasqual *et al.* (1994) ont rapporté l'effet positif de l'hormone de croissance BAP (6-benzylaminopurine) sur l'induction de la callogénèse chez différents cultivars de *C.limon* régénérés par l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate. Lors de notre investigation, avec l'addition 3mg/l de BAP dans le milieu de culture, la plupart des explants des différents génotypes de différentes espèces ont produit des cals au bout de 4 à 9 jours d'incubation après la culture initiale, à l'exception de mandarinier dont certains explants

ont produit des cals après 12 jours, des résultats similaires sont obtenus par Carimi *et al.* (2001). Tous les cals formés atteignent leur taille maximale après un mois de la culture initiale et présentent une structure friable de couleur blanchâtre à la base du style et à la surface de la section en contact avec le milieu de culture (Figure 23).

Aucune manifestation de callogenèse (0%) n'a été observée chez *C.jambhiri* Lush «Rough lemon». Par contre Shawkat et Bushramirza (2006) ont constaté une bonne callogenèse à partir de fragments de tiges et de racines de cette même espèce «Rough lemon» suite à l'addition de l'acide 2,4 dichlorophenoxy acétique (2-4D) au milieu de culture. Ce comportement différentiel des espèces du genre «Citrus», en terme de réponse aux régulateurs de croissance sur l'induction de cals, impose la recherche de conditions optimales pour chaque espèce (Benyahia *et al.*, 2012).

Chez certains génotypes, les cals se sont formés 15 jours après leur mise en culture. Ce retard est dû à l'effet génotypique sur l'induction de la callogenèse. Une constatation comparable est observée par Carimi *et al.* (1999) avec d'autres génotypes de différentes espèces d'agrumes. Aussi et dans le même sens, Carimi (2005) a rapporté l'effet significatif des génotypes sur la formation des cals et qu'il existe une très grande variabilité au sein des génotypes de la même espèce.

Dans notre cas cette constatation laisse suggérer que le retard dans l'apparition des cals est peut-être dû en partie au mauvais état physiologique des plants sources de fleurs, étant donné que les compagnes agricoles de ces cinq dernières années dans la région de Mitidja étaient marquées par les mauvaises conditions climatiques particulièrement les précipitations abondantes qui ont coïncidé avec la période de floraison. Facteur affectant la qualité des fleurs (flétrissement) et favorisant les attaques de certains pathogènes qui ont provoqué des brunissements au niveau du pistil.



**Figure 23** : Formation des cals à partir de style\stigmathe de *C.sinensis*  
«Double fine améliorée» après 4 jours d'incubation

La taille de cals produits diffère selon les espèces et les génotypes de la même espèce (Tableau XI). En effet, à l'instar des espèces étudiées, les explants de *C.limon* et *C.sinensis* ont montré une bonne aptitude à la callogénèse et une taille importante de cals formés (plus de 1-2 cm de diamètre). Le pourcentage d'induction de cals des génotypes de ces espèces est significativement ( $P < 0,01$ ) plus important que celui du reste d'espèces étudiées.

**Tableau XI:** Importance des cals produits des différents géotypes d'agrumes étudiés.

Espèce	Géotype	Taille	Espèce	Géotype	Taille
<i>C. jambhiri</i>				Alger navel	++
<b>Lush</b>	Rough lemon	-		Djirid	+
	Béni Abbes	++		Double fine améliorée	++
	Bornéo	++		Golden Bucky	+
	C.Palermo	++		Maltaise de Tunisie	+
	C.secile	++	<i>C.sinensis</i> (L.) <b>Osbeck</b>	Oranger de bey	++
<i>C. limon</i>	Dellys	+++		Oranger de Blida	+++
<b>(L.) Burm.</b>	Eureka	++		Oranger sidi Ali	+
	Eureka Maroc	++		Sanguine de Biskra	++
	Femminello	++		Shamouti Skikda	+++
	Lisbon 16	+++		Shamouti station	++
	Lisbon 6	++		Thomson navel	++
	Lunario	++		Washington navel	++
	Poire de Commandeur	+		Metidja navel	+++
<i>C. maxima</i>	Pomélo Royal	+	<i>C. reshni</i> <b>Hort. ex Tan</b>	Cleopatra mandarin	+
<b>(Burm.) Merrill</b>	Pomélo Ruby	+		Mandarine de Blida	+
	Pamplemoussier à chaire rose	+	<i>C. reticulata</i> <b>Blanco</b>	Mandarine Temple	+
<i>C. paradisi</i> <b>Macfad,</b>	Pamplemoussier commun	++		Pam Américain	+

Taille des cals: +++ : (2 à 3 cm); ++ : (1 à 2 cm); + : (moins de 1 cm).

Les meilleures aptitudes à la callogénèse ont été observées chez la plupart des génotypes de *C.limon* et *C.sinensis*. Dans le cas de l'espèce *C.limon*, nous avons noté un important taux de callogénèse (entre 100 % et 94,84 %) particulièrement pour les génotypes Fimmenello, Beni Abbés et Lisbon (Figure 24). Des résultats similaires ont été rapportés par Carusso *et al.* (2000). Aussi, Carimi (2005) avait affirmé que *C.limon* possède de meilleures potentialités de callogénèse.

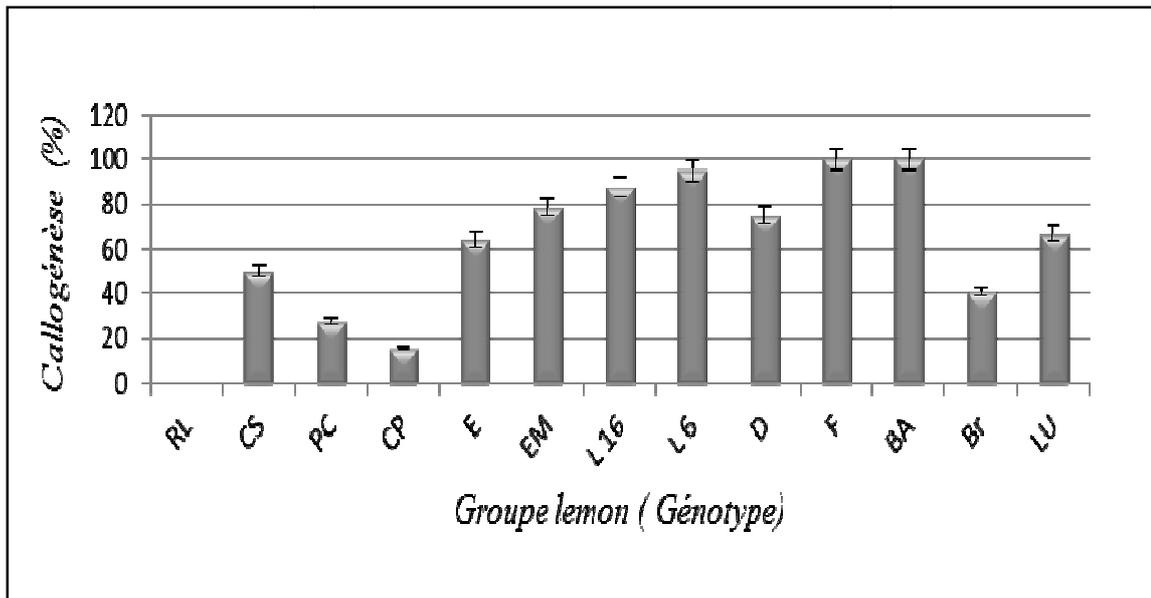
Quant au *C.senensis*, les meilleures potentialités à savoir 100 % ont été observées chez les génotypes Metidja navel, Oranger de Blida et Shamouti de station (Figure 25). Les aptitudes à la callogénèse chez *C.senensis* ont été démontrées par D'Onghia *et al.* (2001). Les autres génotypes de cette espèce ont montré une bonne aptitude à la callogénèse mais d'une importance moindre.

En revanche, les explants des génotypes du groupe mandarinier et *C.paradisi* ont produit un faible pourcentage de cals par rapport aux autres testés (Figure 26 et 27) avec une taille moindre (moins de 1 cm de diamètre) ; Carimi (2005) a signalé le faible potentiel de la callogénèse chez ces deux espèces. Un taux important de brunissement a été observé sur les cals de *C.paradisi* et *C. reticulata* respectivement après deux et six semaines de culture (Figure 29).

Les taux de 66,66% et 100% de cals se sont développés à partir des explants *C.maxima*, (Figure 28), ce pourcentage est important car cette espèce est récalcitrante (Carimi, 2005).

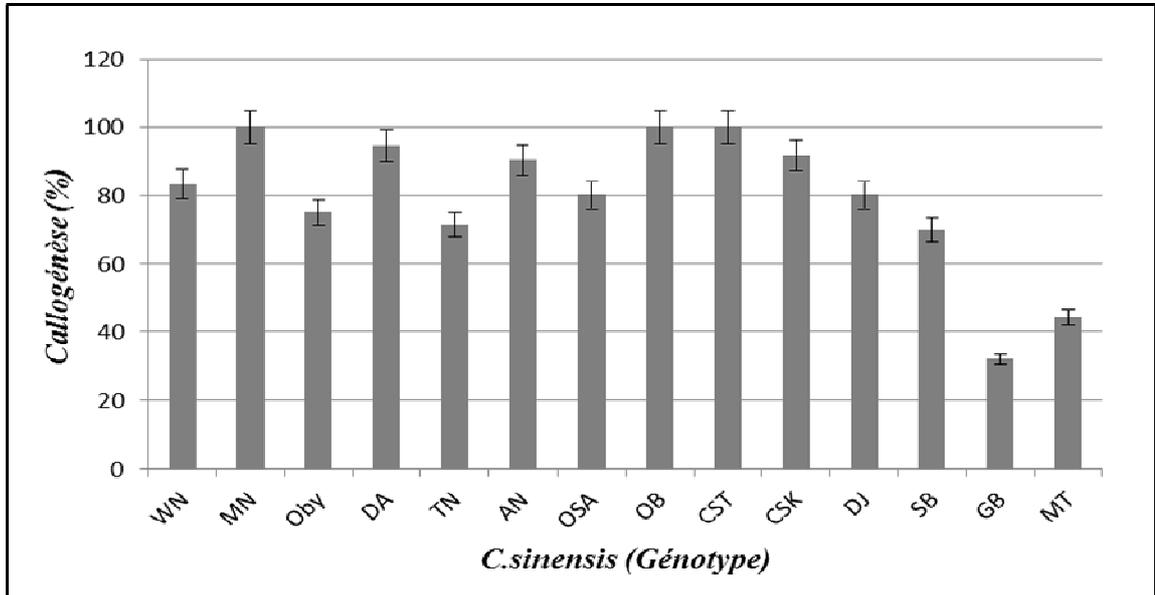
Il est à noter que pour certaines espèces, le pourcentage de la callogénèse est inversement proportionnel avec la taille de cals formés. L'analyse statistique de la callogénèse de l'ensemble des espèces étudiées a mis en évidence l'effet des génotypes qui s'est révélé très hautement significatif sur le pourcentage d'induction de cals.

Périodiquement après 4-6 semaines de la culture initiale des subcultures de cals sont effectuées dans un milieu de la même composition.



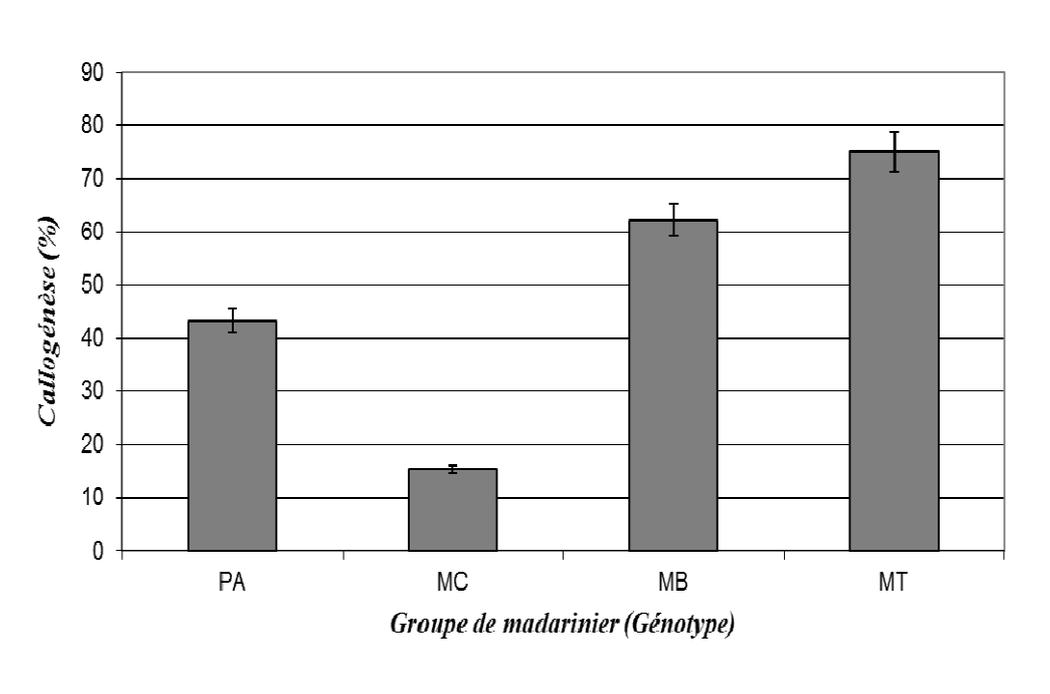
**Figure 24:** Pourcentages de callogenèse chez différents génotypes de *C. limon*.

**RL** (Rough lemon); **CS** (C. Sécile); **PC** (Poire de commandeur) ; **CP** (Citronnier Palermo); **E** (Eureka); **EM** (Eureka Maroc); **L16** (Lisbon 16); **L6** (Lisbon 6); **D** (Dellys); **F** (Femminello); **BA** (Béni Abbes); **Br** (Bornéo); **LU** (Lunario)



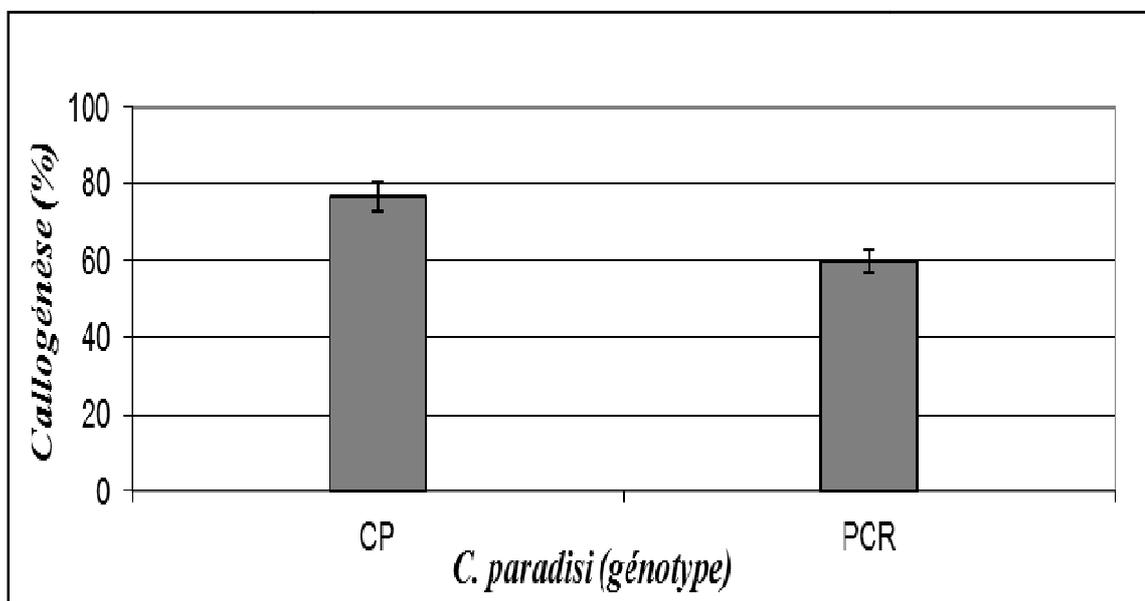
**Figure 25 :** Pourcentages de callogenèse chez différents génotypes de *C. sinensis*.

**WN** (Washington navel); **MN**(Metidja Navel), **OBY** (Oranger de Bey); **DA** (Double fine Améliorée); **TN** (Thomson navel); **AN** (Alger navel); **OSA** (Oranger Sidi Ali); **OB** (Oranger de Blida); **CST** (Shamouti de station); **CSK** (Shamouti de Skikda); **DJ** (Djirid); **SB** (Sanguine de Biskra); **GB** (Golden bucky); **MT** (Maltaise de Tunisie)



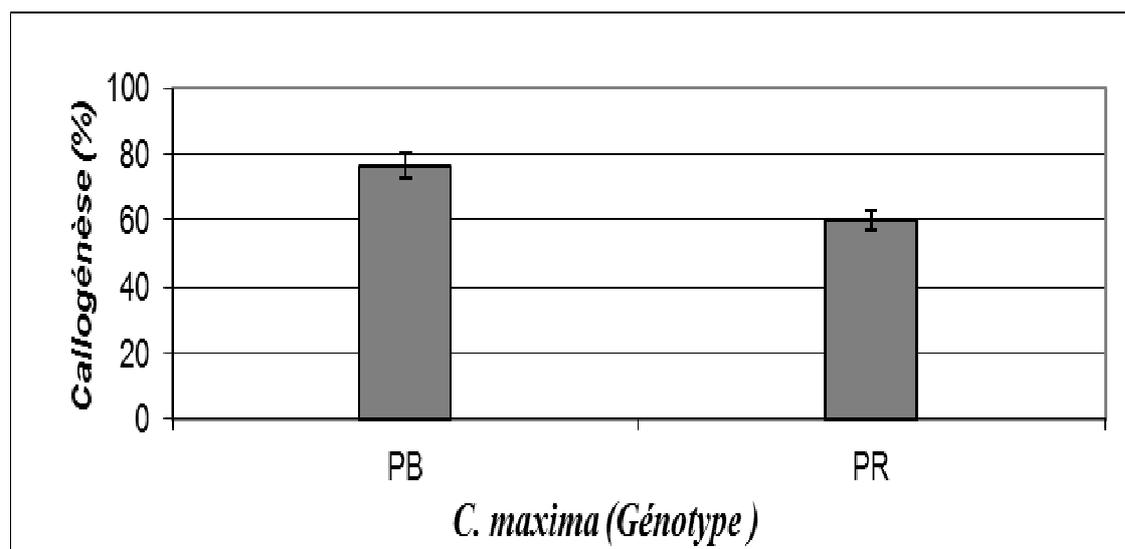
**Figure 26 :** Pourcentages de callogenèse chez le groupe de mandariniers.

**PA** (Pam Américain); **MC** (Mandarine Cléopâtre); **MB** (Mandarine de Blida); **MT** (Mandarine Temple)



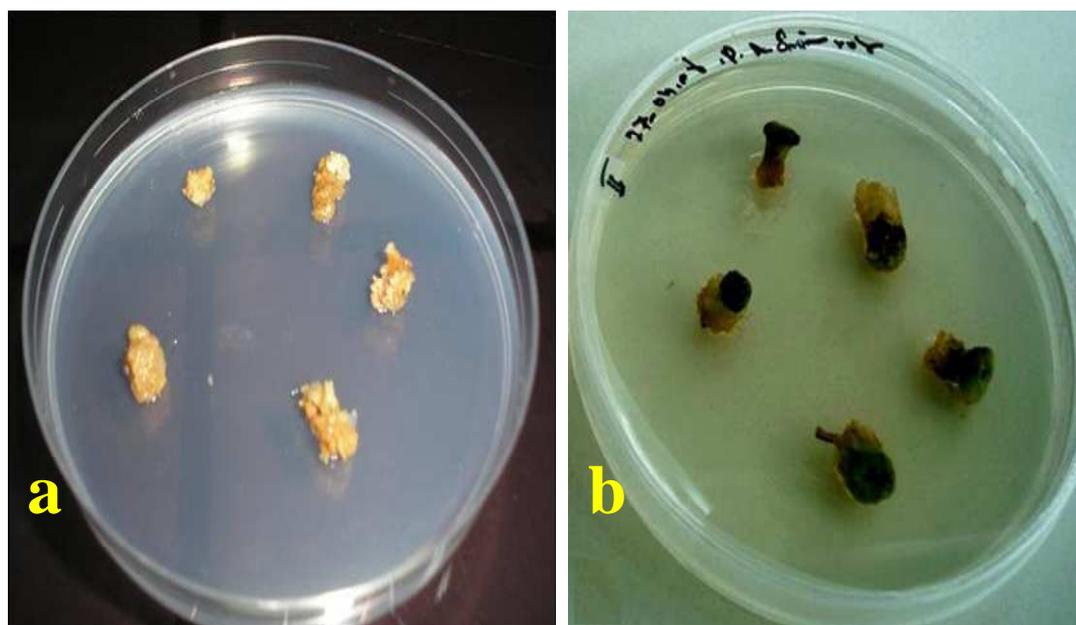
**Figure 27:** Pourcentages de callogenèse chez *C. paradisi*

**CP** (Pamplemoussier commun); **P CR** (Pamplemoussier à chair rose)



**Figure 28:** Pourcentages de callogénèse chez *C.maxima*

**PB** (Pomelo Ruby); **PR** (Pomelo Royal)



**Figure 29:** Brunissement des cals.

**a)** Après 6 semaines (*C. reticulata*); **b)** Après 2 semaines (*C. paradisi*)

### VI.2.2. Le potentiel embryogène des différents géotypes

Selon Ricci *et al.* (2002), la régénération des plants du genre *Citrus* par la culture des tissus *in vitro* implique une embryogenèse somatique indirecte. En effet, l'ensemble des embryons formés au cours de notre investigation se sont initiés à partir des cals (Figure 30) dans un intervalle de 38 à 150 jours après la culture initiale (Tableau XII).

Ces résultats sont légèrement différents de ceux obtenus par D'Onghia *et al.* (2001) et Carimi (2005) dont la période d'apparition des embryons somatiques était de 2 à 5 mois après la mise en cultures des explants

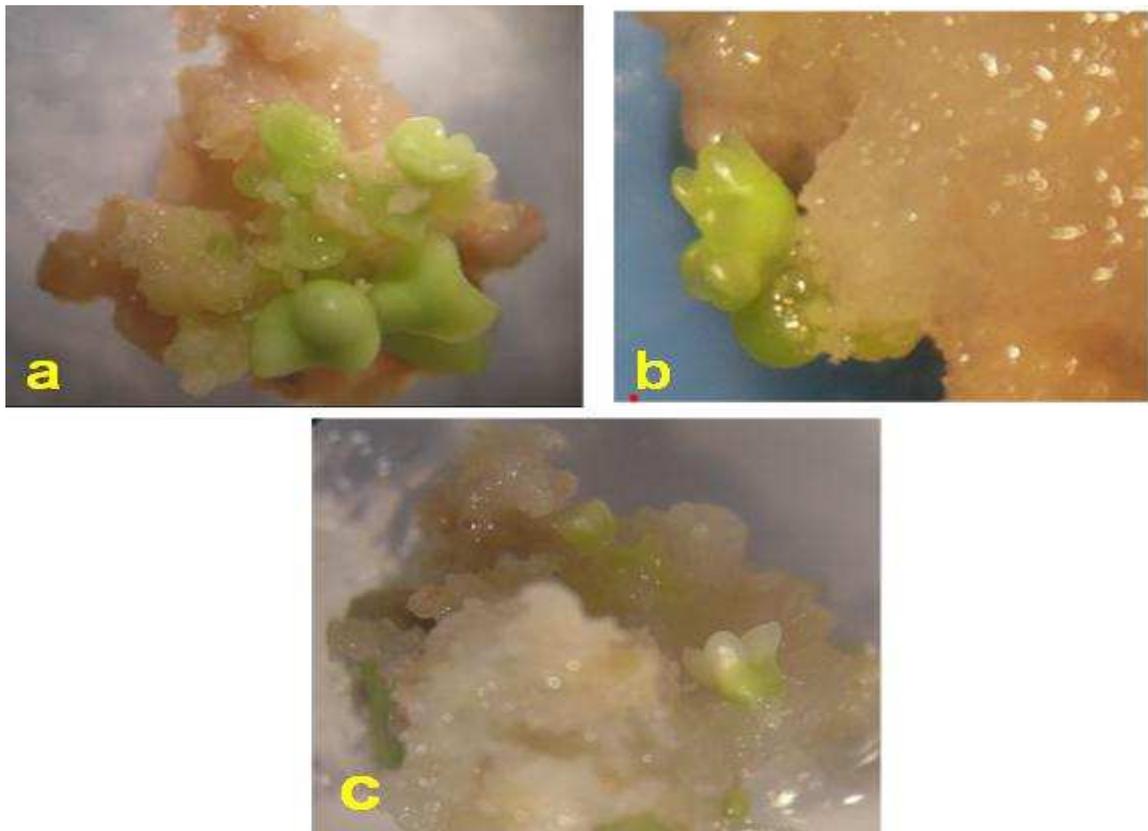
**Tableau XII:** Différentes périodes de différenciation embryonnaire chez géotypes de *C.senensis* et *C.limon*.

Espèce	Géotype	Embryons somatiques Formation (Jours)
<i>C.senensis</i>	Washington navel	90
	Mitidja Navel	50
	Double fine améliorée	47
	Sanguine de Biskra	150
<i>C.limon</i>	Lisbonne 16	40
	Lisbonne 6	46
	Lunario	53
	Eureka	41
	Eureka maroc	38
	Bornéo	108
	Dellys	58
Feminello	51	

Après l'induction de l'embryogénèse somatique, les embryons sont transférés individuellement dans un milieu MS sans l'hormone BAP pour continuer leur développement. Von Arnold *et al.* (2002) ont rapporté que les milieux dépourvus de régulateurs de croissance inhibent la prolifération cellulaire et stimulent la formation des embryons et le début de leur développement.

Les observations effectuées d'une manière régulière sur l'évolution des embryons formés nous a permis de distinguer les différents stades de formation d'embryon somatique «formes globulaires, cordiforme et cotylédonaires» (Figure 31).

Selon Carimi *et al.* (1999), à l'instar de toutes les espèces d'agrumes, l'induction à l'embryogénèse est rapide chez le citronnier (après deux mois). Toutefois, il est à signaler que nos résultats sont plus satisfaisants car l'embryogénèse somatique s'est déclenchée plus précocement particulièrement, chez le génotype «Eureka Maroc» à savoir après 38 jours de culture.



**Figure 30 :** Formation des embryons somatiques à partir des génotypes de *C.limon*

a) Dellys; b) Béni Abbes; C) Bornéo

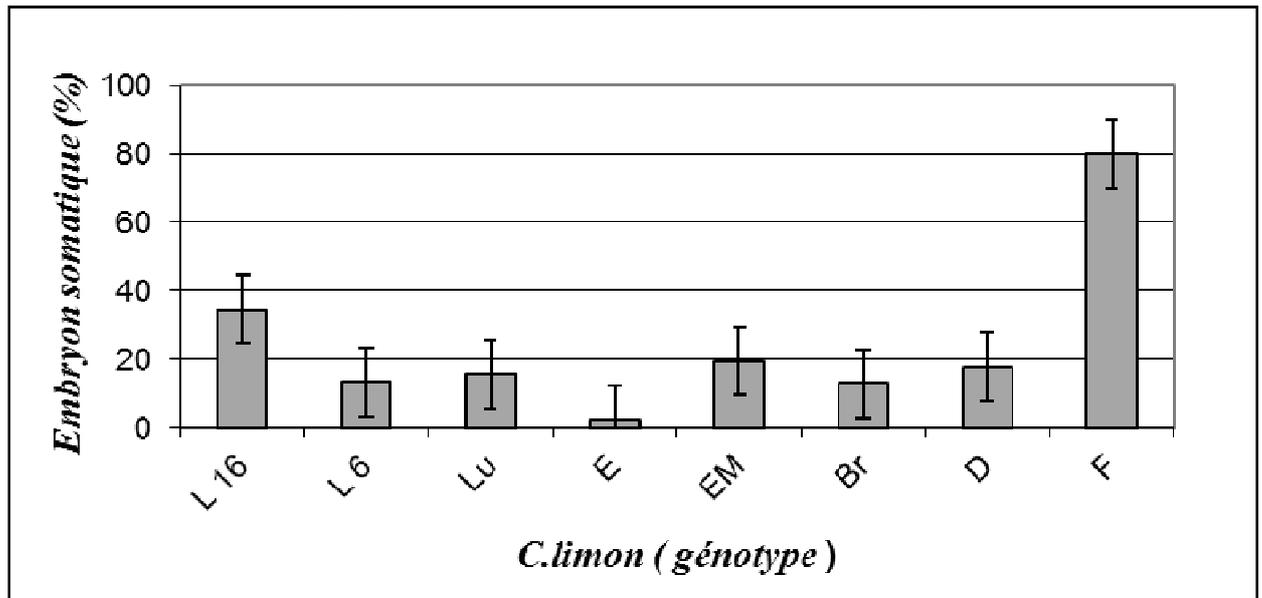


**Figure 31 :** Différents stades de formation d'embryons somatiques  
Chez *C.limon* «Femminello» à partir de la culture de style et stigmate *in vitro*.

Il est à noter que le pourcentage de cals embryogènes est Très significativement influencé par les génotypes. Carimi (2005) a rapporté que le facteur génotypique compte parmi les facteurs les plus influents dans l'induction de l'embryogenèse somatique chez les agrumes. Ce même auteur a montré dans plusieurs publications qu'il existe une très grande variabilité entre les espèces et les génotypes de la même espèce.

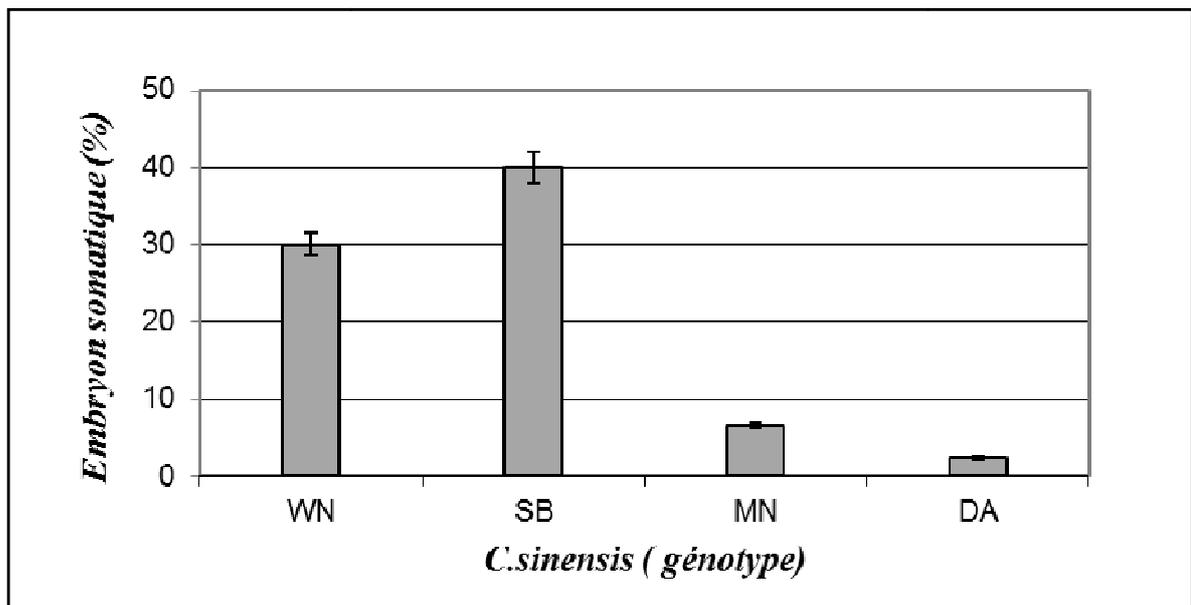
L'analyse de la variance a mis en évidence l'effet hautement significatif ( $p < 0.01$ ) des génotypes sur le pourcentage d'explants embryogènes qui varie entre 2,35% chez la «Double fine améliorée» et 80 % chez la «Femminello». Carimi *et al.* (1994) avaient signalé l'effet positif de l'hormone de croissance (BAP) sur l'induction de l'embryogenèse somatique des explants de pistil ou d'ovule de différentes espèces d'agrumes du genre *Citrus*.

Dans notre étude, les génotypes de *C.limon* ont exprimé une haute potentialité embryogène par rapport aux autres espèces d'agrumes (Figure 32). Dans des travaux similaires aux nôtres, Carimi *et al.* (1994) et Carimi (2005) ont rapporté que les génotypes de *C.limon* sont régénérés avec succès à partir de style et stigmate. Effectivement, un taux important d'embryons somatiques a été observé avec les génotypes de «Femminello» et «Lisbon 16» (80 %) et (34,78%), respectivement.



**Figure 32 :** Le pourcentage d'embryons somatiques formés à partir de style et stigmaté de différents génotypes de *C. limon* après 5 mois de culture.

**L16** (Lisbonne 16); **L6** (Lisbonne 6); **LU** (Lunario); **E** (Eureka); **EM** (Eureka Maroc); **Br** (Bornéo); **D** (Dellys); **F** (Femminello)



**Figure 33:** Le pourcentage d'embryons somatiques formés à partir de style et stigmaté de différents génotypes de *C. sinensis* après 5 mois de culture.

**WN** (Washington navel); **SB** (Sanguine de Biskra); **MN** (Metidja Navel), **DF** (Double fine Améliorée)

Il est à signaler qu'avec l'espèce *C.limon*, des résultats très prometteurs ont été obtenus avec un génotype algérien «Dellys» (17,85%). Aussi, des embryons somatiques se sont formés précocement à savoir 38 jours après la culture initiale partir des explants de «Eureka Maroc». Nos résultats viennent rejoindre ceux de Carimi et De Pasquale (2003) et Carimi (2005) qui ont confirmé dans de nombreux travaux que le taux important de formation d'embryons somatiques chez le citronnier dépend des génotypes.

D'Onghia *et al.* (2000a) ont rapporté qu'en plus du citronnier, les orangers et particulièrement les navels possèdent un haut potentiel embryogénique (Figure 33). Effectivement, parmi les explants de différents génotypes d'oranger mis en culture, des embryons ont été obtenus avec «Washington navel» (30 %), «Metidja navel» (6,66%) et «Sanguine de Biskra» (40 %). Les deux derniers sont des génotypes algériens.

Le pourcentage d'embryons somatiques formés par l'oranger «Double fine améliorée» était faible à savoir (2,4%). Néanmoins, avec ce génotype l'embryogenèse somatique s'est déclenchée précocement 47 jours après la culture initiale.

Extraordinairement, le pourcentage d'embryons somatiques formés à partir des explants de l'espèce *C.maxima* «pomelo Ruby» est faible (10 %). Seulement, ce résultat est très important et très prometteur vu qu'aucun rapport sur l'application de l'embryogenèse somatique sur ce génotype n'est disponible à notre connaissance (Figure 34).



**Figure 34** : Formation des embryons somatiques à partir des calcs de *C.maxima* «Pomélo Roby».

Selon Carimi (2005), *Citrus paradisi* est caractérisé par une faible aptitude embryogénique. Malgré cela, durant notre expérimentation toutes les tentatives d'induire l'embryogenèse somatique à partir des cals de cette espèce avaient échoué. Aucune différenciation embryonnaire n'a été observé chez les génotypes de cette espèce. Le même constat a été mis en évidence pour les génotypes de *C. reticulata*. Nos résultats ne concordent pas avec ceux obtenus par D'Onghia et al. (2001) dont les travaux ont signalé le faible pouvoir embryogène de ces deux espèces.

Toutefois, il a été rapporté par Carimi (2001) que plusieurs facteurs influencent la réussite de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate tels que les conditions de culture et les fleurs sources d'explants. Ces dernières, doivent être collectées avant leur ouverture et conservées pour une durée inférieure à 4-5 jours à 4°C. Aussi, les chances d'induire de la callogenèse et l'embryogenèse somatique à partir des tissus âgés sont minimales.

### VI.2.3. Germination des embryons somatiques

De nombreux chercheurs ont rapporté que les embryons somatiques capables de germer et d'évoluer en plantules ont été obtenus à partir d'explants floraux .

Après, l'induction de l'embryogenèse somatique, les embryons formés sont transférés dans un milieu de culture MS sans l'hormone de croissance BAP pour continuer leur développement et germer. En effet, la germination des embryons a été observé sur différentes périodes à savoir 4 à 6 semaines après l'apparition des embryons primaires (Figure 35). Le processus de l'embryogenèse aboutit à la production de structures bipolaires, c'est-à-dire comprenant un axe apical et racinaire (Sihachakr *et al.*, 1994). En effet, des plantes complètes sont obtenues directement suite au processus de germination. Ces plantules sont morphologiquement identiques aux plantes mères et à croissance normale.

Cependant, il a été constaté que le taux d'embryons germés varie selon les espèces et les génotypes. Effectivement le taux de conversion des embryons en plantes entières a été important chez *C. limon* comparé au *C. sinensis* (80%) et (50%) respectivement. Des résultats similaires ont été rapporté par Carimi *et al.* (1999).

Les plantules régénérées sont transférés dans des tubes à essai contenant un milieu MS sans hormone à raison d'une plantule/tube à essai (Figure 36) et ce pour une période de deux mois afin de compléter leur développement avant le passage à la phase d'acclimatation.



**Figure 35 :** Germination des embryons somatiques de *C.limon* «Dellys»



**Figure 36:** Conversion des embryons somatiques de *C.limon* «Dellys» en plantules.

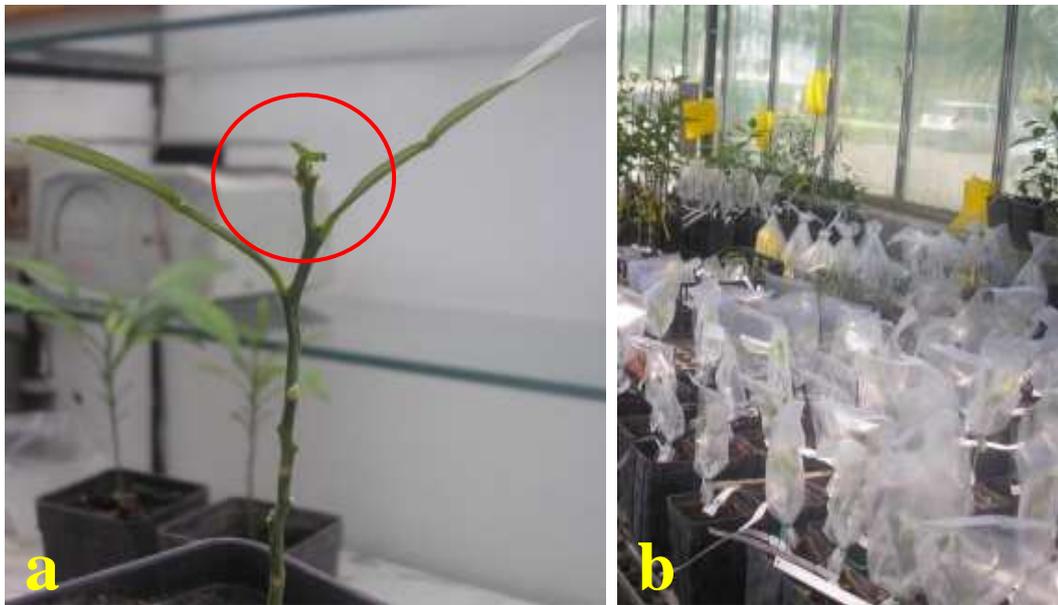
Photo prise après un mois de transfert dans les tubes à essais.

### VI.2.3.1 Acclimatation des plantules régénérées

Le transfert des plantules régénérées de la culture *in vitro* au sol directement est très difficile et présente souvent un échec. Dans notre investigation, après 2 mois d'incubation, les plantules régénérées sont retirées des tubes à essais et transférées *in vivo* par un mini-greffage sur un porte greffe *Citrange troyer* âgé de 3 à 4 mois selon le protocole décrit par Depasquale *et al.* (1999) (Figure 37a). Ces mêmes auteurs ont rapporté l'efficacité de cette méthode dans

la réussite du passage des plants régénérés dans les conditions *in vitro* vers *in vivo* particulièrement les plants dont l'enracinement est difficile.

Les plants greffés sont recouverts par des sacs en polyéthylène et placés par la suite dans une serre d'acclimatation à 25°C pour compléter leur développement (Figure 37 b)



**Figure 37 :** Acclimatation des plantules régénérées par l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate.

a) Mini-greffage de la plantule régénérée sur *Citrange troyer* ; b) Plants régénérés sous serre pour acclimatation

### VI.2.3.2 Evaluation de l'état sanitaire des plantules régénérées.

De nombreux travaux ont rapporté l'efficacité de la technique d'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate dans l'élimination des pathogènes affectant les agrumes (D'Onghia *et al.*, 2000a).

L'ensemble des embryons obtenus et les plants régénérés ont été testé pour l'évaluation de leur état sanitaire par l'emploi des différentes techniques de diagnostic (Indexage biologique, sérologique et moléculaire) utilisées pour les plants mères.

L'ensemble des infections à virus et à viroïdes détectées dans les plants mères sont inexistantes dans les plants régénérés. Ce résultat confirme l'efficacité de la technique dans l'élimination de pathogènes et l'assainissement des agrumes. Les résultats de notre étude sont en accord avec ceux rapportés par D'Onghia *et al.* (2001), D'Onghia *et al.* (2000a) et Caruso *et al.* (2000).

### VI.3. Evaluation de la conformité génétique des plants d'agrumes régénérés

L'objectif principal de ce travail est de mettre en place une nouvelle méthode d'assainissement et de multiplication végétative des agrumes en respectant la conformité variétale. L'ensemble des embryons somatiques formés ont été obtenu à partir de cals.

Seulement, plusieurs auteurs ont rapporté que des variations génétiques et phénotypiques (variations somaclonales) peuvent se développer lors de la régénération des plants *in-vitro* (Larkin et Scowcroft, 1981; Kaeppler et *al.*, 2000). Ces variantes sont souvent le résultat d'un passage par une phase indifférenciée (passage par le stade du cal), (Phillips et *al.*, 1991).

De ce fait l'évaluation de la stabilité génétique des clones obtenus *in vitro* est une étape primordiale pour la micropropagation et la multiplication des plants conformes à la plante initiale (Eshraghi *et al.*, 2005). Les techniques moléculaires sont à l'heure actuelle des outils puissants, fiables et très utilisés dans l'analyse de la fidélité génétique des plantes obtenues *in vitro* (Rahman et Rajora, 2001).

Plusieurs marqueurs d'ADN ont été utilisés avec succès pour évaluer la stabilité génomique chez les plantes régénérées. Les marqueurs moléculaires de types empreintes génétiques sont les plus utilisés pour l'analyse des ressources génétiques permettant une meilleure compréhension des relations phylogénétiques et taxonomiques entre les différentes espèces (Xiao *et al.*, 2009).

Lors de notre investigation, une quinzaine de régénérants obtenus par l'embryogénèse somatique *via* la culture de style et stigmate ont été testé pour l'évaluation de leur stabilité génétique. L'utilisation des douze amorces nucléotidiques employées durant l'analyse d'empreintes génétiques par ISSR a engendré un nombre total de 179 bandes bien différenciées (en moyenne une quinzaine par paire d'amorces allant de 8 à 25).

La longueur des fragments amplifiés varient entre 250 pb [amorces ISSR 1-6 et ISSR12+12b], et 2.5 kb [amorces ISSR1-6, ENEA34, ISSR3+3b et ISSR10+10b]. Chez le *C. limon*, les amorces d'ISSR ont donné naissance à une moyenne de 111 amplifiât, en totalité monomorphes parmi les plants testés (Tableau XIII).

Cependant, chez W. Navel et Metidja Navel, les marqueurs ont permis l'identification de 113,5 bandes en moyenne, parmi lesquelles, 8 (7,0%) et 27 (23,5%), respectivement sont apparues polymorphes

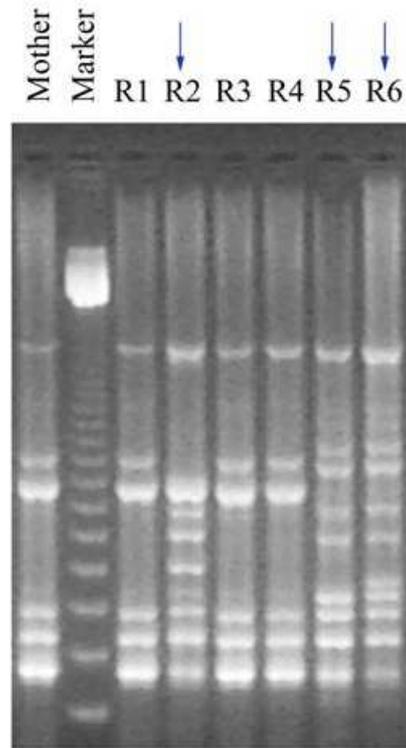
Au niveau de ces géotypes, le nombre de bandes polymorphiques générées par amorce varie entre 3 [amorce ENEA34, (Figure 38)] et 7 [amorce ISSR 12+12b].

Les plants régénérés à partir de Metidja Navel ont montré un fragment génétique polymorphe pour 8 amorces des 12 utilisées dans cette étude, tandis qu'avec le géotype W. Navel, les plants mères ainsi que les plants régénérés ont montré le même profil seulement pour ISSR 12-12 (Figure 39).

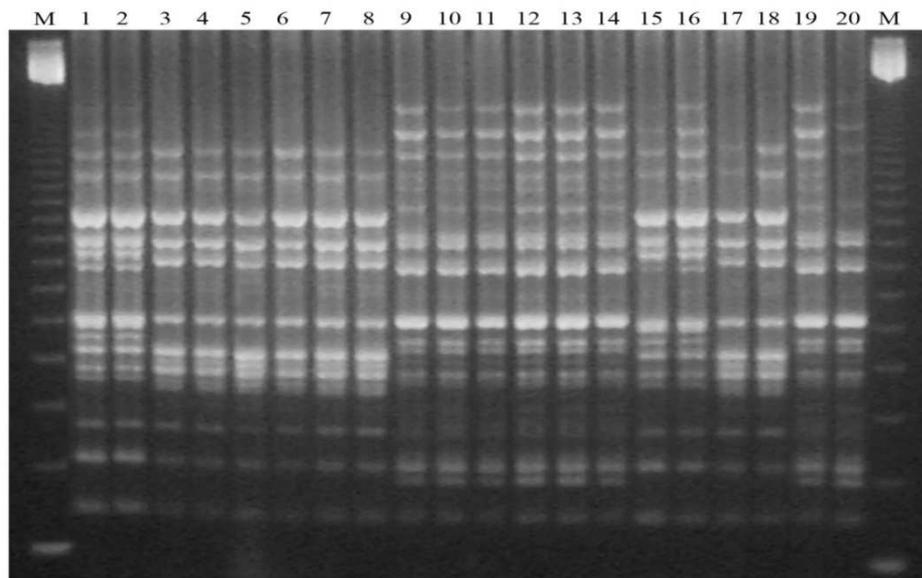
**Tableau XIII :** Empreintes génomiques ISSR des pieds mère et des plants régénérés issus de *C. limon* (Dellys, Bornéo et Beni Abbés) et *C. sinensis* (Washington Navel et Metidja Navel).

Espèce	Géotype	Loci (Nbr total)	Loci polymorphiques (Nbr)	Polymorphisme (%)
<i>C. limon</i>	Dellys	118	0	0.0
	Bornéo	103	0	0.0.
	Beni Abbes	111	0	0.0
<i>C. sinensis</i>	Washington Navel	112	8	7.0
	Mitidja Navel	115	27	23.5

Karp (1991) a montré que les conditions environnementales, notamment les régulateurs de croissance, avaient un effet sur l'induction de la variation somaclonale chez les plants régénérés in vitro, par contre, Siragusa et al. (2007) ont rapporté qu'en présence de la BAP dans les milieux de cultures aucune variation dans la stabilité génétique n'a été observée. Cette constatation laisse suggérer que le polymorphisme observé lors de notre investigation chez deux géotypes de *C. sinensis* est loin d'être induit par l'hormone de croissance que nous avons utilisé en l'occurrence la BAP.



**Figure 38 :** Gel représentant les empreintes génomiques ISSR (Enea34 ) de plant mère et des plantes régénérées issues de *C. sinensis* (Washington Navel)  
**M:** 123 bp marker (Invitrogen), **Line 1:** Washington Navel (Plant mere) ; **Line 3-4-5-6-7-8** Régénérants R1, R2, R3, R4, R5



**Figure 39 :** Gel représentant les empreintes génomiques ISSR des plants mères et des plantes régénérées issues de *C. limon* (Dellys, Bornéo et Beni Abbés) et *C. sinensis* (Washington Navel et Metidja Navel).

**M:** 123 bp marker (Invitrogen), **Line 1-2** Dellys: échantillon DR1E1, R1P1L2; **Line 3-4-5** Borneo: échantillon L3, L5, R10E5; **Line 6-7-8** Beni Abbés: échantillon L3, L4, L5; **Line 9-10-11-12-13-14** W. Navel: échantillon L2, L4, L5, L7, L8, L10; **Line 15** Metidja Navel: échantillon L1; **Line 16** Dellys (Plant mere); **Line 17** Borneo (Plant mere); **Line 18** Beni Abbes (Plant mere); **Line 19** W. Navel (Plant mere); **Line 20** Metidja Navel (Plant mere).

# Conclusion générale

L'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et de stigmate est une technique récente mise au point par Carimi *et al.* (1994). Elle apparaît comme un puissant outil qui permet de régénérer un taux élevé de plants d'agrumes indemnes de maladies et génétiquement identiques aux plantes mères (D'Onghia *et al.*, 2000a).

Cette technique permet de réaliser l'objectif principal de notre travail qui est l'assainissement et la régénération de différents génotypes d'agrumes dont certains locaux appartenant à 7 espèces : *C.sinensis* (L.) Osbeck, *C. limon* (L.) Burm, *C.reticulata* Blanco, *C.paradisi* Macfad, *C.resnyi* Hort. ex Tan., *C.jambhiri* Lush et *C.maxima* (Burm.) Merrill.

Notre étude a été menée dans des conditions expérimentales locales et les résultats satisfaisants obtenus représentent le tout premier rapport sur la régénération et l'assainissement des agrumes par l'embryogenèse somatique en Algérie.

L'évaluation de l'état sanitaire du matériel végétal utilisé comme source d'explants (la plante mère et les fleurs) par l'indexage biologique, sérologique et moléculaire, a révélé la présence de plusieurs infections mixtes dues aux virus et viroïdes. La plupart des génotypes testés ont réagi positivement au test DAS-ELISA pour la détection du CTV et CPsV ainsi que pour le test TAS-ELISA pour le CVV.

L'outil moléculaire (RT-PCR) a mis en évidence la présence de plusieurs viroïdes avec une dominance du *Citrus exocortis* Viroid (CEVd) et Hop StuntViroïd (HSVd) chez la majorité des génotypes des différentes espèces d'agrumes testées.

L'ensemble des résultats de diagnostic des plants mères obtenus a été confirmé par l'indexage biologique des échantillons collectés à partir des plantes indicatrices inoculées.

Après la culture initiale pendant 4 à 9 jours, la callogénèse s'est déclenchée chez la plupart des explants des 7 espèces d'agrumes étudiées, à l'exception de ceux de mandarinier dont certains explants ont produit des cals qu'après le douzième jour de la culture initiale. Les cals produits à la base du style sont friables de couleur blanchâtre. Pour certains génotypes, le pourcentage de cals formés est inversement proportionnel à leur taille. C'est le cas du citronnier Femminello dont le potentiel de callogénèse est de 100%, alors que la taille des cals était de 1,5 cm, tandis qu'avec le citronnier Dellys 75 % de cals ont été obtenus avec une taille de 3 cm. La taille des cals varie selon l'espèce et les génotypes de la même espèce.

Tous les calcs formés atteignent leur taille maximale (2-3 cm) après un mois de la culture initiale.

En comparant, les résultats obtenus avec les 7 espèces d'agrumes testées, une meilleure aptitude à la callogenèse a été observée chez la plupart des génotypes de *C. limon* et *C. sinensis*. Des résultats similaires ont été rapportés par Carimi (2005).

L'ensemble des génotypes étudiés ont exprimé une bonne aptitude à la callogenèse à savoir *C.limon* (0 % à 100 %), *C.senensis* (32,14 % à 100 %), le groupe des mandariniers (15,38 % à 75 %), *Citrus paradisi* (76,47 % à 60 %) et *Citrus maxima* (66,66 % à 100 %). Pour cette dernière espèce, le résultat est très intéressant et exceptionnellement différent de celui obtenu par Carimi en 2005 qui a rapporté que cette espèce est récalcitrante. Un taux important de brunissement a été observé sur les calcs de *C.paradisi* et *C. reticulata* respectivement après deux et six semaines de culture.

L'induction de l'embryogenèse somatique indirecte a été observée dans un intervalle de 38 à 150 jours après la culture initiale. Treize génotypes d'agrumes parmi les 35 étudiés ont pu induire la formation d'embryons somatiques. Les meilleures potentialités embryogènes ont été observées chez 8 génotypes de *C.limon* suivis par 4 de *C.sinensis* et 1 de *C.maxima*. Le pourcentage de calcs embryogènes est significativement influencé par les génotypes. Ce pourcentage varie entre 2,35% chez «Double fine améliorée» et 80% chez «Femminello».

Les génotypes de *C.limon* ont exprimé une haute potentialité embryogène par rapport aux autres espèces d'agrumes, un taux important d'embryons somatiques a été observé chez le «Femminello» et «Lisbon 16» soit respectivement 80 % et 34,78 %. Des résultats très prometteurs ont été obtenus avec un génotype algérien le citronnier «Dellys» (17,85 %). Aussi des embryons somatiques se sont formés précocement à savoir 38 jours après la culture initiale à partir des explants de «Eureka Maroc».

Une bonne aptitude embryogène a été observé chez certains génotypes de *C.sinensis* particulièrement «Washington navel» (30 %), et deux génotypes algériens à savoir «Metidja navel» (6,66%) et «Sanguine de Biskra» (40 %).

Extraordinairement, le pourcentage d'embryons somatiques formés à partir des explants de l'espèce *C.maxima* «Pomelo Ruby» est faible (10 %). Seulement, ce résultat est très important et très prometteur vu qu'aucun rapport sur l'application de l'embryogenèse somatique sur ce génotype n'est disponible à notre connaissance.

Aucune différenciation embryonnaire n'a été observée chez les génotypes du groupe mandarinier (*C. reticulata* et *C. reshni*) et *Citrus paradisi*, selon la littérature ces espèces sont caractérisées par un faible potentiel embryogène.

Après l'induction de l'embryogenèse somatique, la germination des embryons obtenus a été observée après 4 à 6 semaines. Le taux de conversion des embryons en plantes entières a été important chez *C. limon* comparé au *C. sinensis* soit respectivement 80 % et 50 %.

Afin d'évaluer le taux d'assainissement des génotypes infectés, les embryons obtenus et les plants régénérés ont été testés par les diagnostics biologiques, sérologique et moléculaire. Tous les pathogènes à savoir virus et viroïdes détectés dans les plants mères sont absents dans les plants régénérés. Ce résultat satisfaisant confirme l'efficacité de l'embryogenèse somatique à partir de la culture de style et stigmate dans l'assainissement des agrumes.

Pour vérifier la conformité et la stabilité génétique des plants régénérés, des marqueurs moléculaires de type empreintes génétiques ISSR ont été utilisés pour une quinzaine de plants. Il est à signaler qu'au début de notre travail, on prévoyait d'analyser la conformité de l'ensemble des plantules obtenues par l'embryogenèse somatique. Cependant, la perte des échantillons de plants mères avant leur analyse nous a obligé à reconsidérer cette décision. De ce fait, les plantules de différents génotypes de deux espèces ont été analysées à savoir *C. limon* «Dellys, Bornéo, Beni Abbés» et le *C. sinensis* «Washington Navel, Metidja Navel». Toutes les plantes sont identiques à la plante mère à l'exception des plants régénérés à partir de Metidja Navel qui ont montré un fragment génétique polymorphe pour 8 amorces des 12 utilisées dans cette étude, tandis qu'avec le génotype W. Navel, les plants mères ainsi que les plants régénérés ont montré le même profil seulement pour les ISSR 12-12.

Au terme de notre étude, le potentiel embryogène des génotypes de différentes espèces de la collection nationale des agrumes a été mis en évidence. L'efficacité de la technique dans l'assainissement des agrumes a été confirmée et toutes les infections détectées dans les plants mères sont inexistantes dans tous les embryons convertis en plantes.

L'ensemble des plants régénérés sont conformes, cependant la maîtrise de la variabilité génétique détectée dans les génotypes du groupe navel pourra faire l'objet d'autres études.

D'autres investigations doivent d'être menées pour évaluer le potentiel embryogène de tous les génotypes autochtones algériens et les génotypes importants de point de vue économique.

La réussite de l'application de l'embryogenèse somatique à partir de la culture *in vitro* de style et stigmate facilite l'utilisation de cette technique pour : **1)** la conservation du germoplasme des agrumes *in vitro*; **2)** la production d'un taux élevé de plants génétiquement identiques aux plants mères (une reproduction fidèle de toutes les caractéristiques variétales); **3)** L'obtention de plants indemnes de toute maladie (un taux d'assainissement élevé:100%).

La maîtrise de l'embryogenèse somatique à partir de style et stigmate et son intégration dans les programmes de certification, permettra la valorisation et la préservation de notre patrimoine agrumicole et la relance de l'agrumiculture dans notre pays.

## *Références bibliographiques*

1. **Ammirato P.V. (1983).** Embryogenesis. In: DA Evans, WR Sharp, PV Ammirato & Y, Yamada (eds). *Handbook of Plant Cell Culture*. Macmillan, New York, 82–123.
2. **Ammirato P.V. (1987).** Organizational events during somatic embryogenesis. In: Green, C.E., Somers, D.A., Hackett W.P & Biesbor D.D. (eds ) *Plant Tissue and Cell Culture*. New York, Alan R. Liss, 57 – 81.
3. **Anonyme (2006).** Recovery plan for Huanglongbing (HLB) or Citrus Greening caused by “*Candidatus*” *Liberibacter africanus*, *L. asiaticus*, and *L. americanus*”. *The American Phytopathological Society (APS)*, 21p
4. **Aouane D., Ghezli C. (2001).** Evaluation des maladies des agrumes transmissibles par greffage sur le matériel végétal de multiplication de l'ITAF. Options Méditerranéennes. Série B. CIHEAM (eds). Etudes et Recherches N° 43, pp. 101-104
5. **Aubert B. et Vullin G. (1997).** Pépinières et plantations d'agrumes. Techniques. Ed. Quae. 184p
6. **Barbossa L. et Savino V. (2006).** Sensitive and specific digoxigenin-labelled RNA probes for routine detection of *Citrus tristesa virus* by dot- blot hybridation. *Journal of phytopathology*, 154: 329-335.
7. **Bar-Joseph M., Garnsey S.M., Gonsalves D., Moscovitz M., Purcifull D.E., Clark M.F. et Loebenstein G. (1979).** The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 69: 190-194.
8. **Baysal Ö., Siragusa M., Gümrükcü E., Zengin Carimi S.F., Carimi F. et Sajeve M. (2010).** Molecular Characterization of *Fusarium oxysporum f. melongenae* virulence by ISSR and RAPD markers on eggplant. *Biochem. Gen.*, 48:524 e 37.
9. **Beloualy N. (1991).** Plant regeneration from callus culture of three *Citrus* rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24: 29-34
10. **Besse 1., Verdeil J. L.; Duval Y; Sotta B.; Maldiney R. et Miginiac, E. (1992).** Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Clonal fidelity: endogenous cytokinins and indolacetic acid in embryogenic caHus cultures. *J. of Exp. Bot.*, 43: 983-939.
11. **Beulé T. (2006).** Recherche de marqueurs moléculaires précoces de de l'anomalie *mantled* par analyse du transcriptome du palmier dattier à l'huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Sciences de la vie et de la Terre. 21p
12. **Boulay M. (1993).** Rosier, vigne : deux exemples de transformation génétique utilisant l'embryogenèse somatique. *XIIIè colloque I.A.P.T.C.* France : l'embryogenèse somatique, approches cellulaires et moléculaires, 16-17 novembre 1993, Montpellier : 37-38.

13. **Bové J.M., Foissac X. et Saillard C. (1993).** Spiralins. *Subcell. Biochem.* 20: 203- 223.
14. **Bové J.M. (1995).** Virus and virus-like diseases of citrus in the Near East region. *F.A.O. Rome Eds*, 518 p.
15. **Bové J.M. et Garnier M. (1997).**Recent developments in phloem-restricted, wall-less bacteria of citrus: *CandidatusPhytoplasmaaurantifolia* and *Spiroplasmacitri*, two mycoplasmal plant pathogens.*International Congress of Citrus Nurserymen* N°5, Montpellier In: *Fruits* vol. 52, n° 6 , pp. 349-359
16. **Bové J.M. (2006).**Huanglongbing. A destructive, newly emerging, century old diseases of citrus. *J. of plant pathol.*, 88:7-37.
17. **Breton M. (2009).** Les plasmides pSci de *Spiroplasmacitri* GII3 : caractérisation fonctionnelle et rôle dans la transmission par l'insecte vecteur. Thèse de doctorat. Université Victor Segalen Bordeaux 2.173p
18. **Brlansky R.H. et Timmer L.W. (2012).**2012 Florida Citrus Pest Management Guide: Exocortis, Cachexia, and Other Viroids. Florida Citrus Pest Management Guide. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.pp179
19. **Buiatti M. (1977).** DNA Amplification and Tissue Cultures, in Rein ert, J. and Bajaj Y.P.S., (Eds.), Springer Verlag, *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture'*, pp.358-374.
20. **Calavan E.C., Roistacher C.N., Nauer E.M. (1972).**Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. *Plant Dis. Rep.* 56: 976-980.
21. **Cambra M., Assensio M., Gorris M.T., Perez E., Moya J.J., Lopez Abella D. et Sanz A. (1995).** Detection of Plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural proteins. OEPP/ EPPO Bulletin, 24: 569-577.
22. **Cambra M.,Bertolini E.,Olmos A. et Capote N. (2006).**Molecular methods for detection and quantitation of virus in Aphids. *Virus Diseases and crop Biosecurity.* (eds) *springer*, 81-88
23. **Carimi F., De Pasquale F. et Crescimanno F.G. (1994).**Somatic embryogenesis from styles of lemon (*Citrus limon*). *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 37: 209-211.
24. **Carimi F., De Pasquale F. et Crescimanno F.G. (1995).** Somatic Embryogenesis in *Citrus* from styles culture. *Plant Science*, 105, 81-86.
25. **Carimi F., De Pasquale F. et Crescimanno F.G. (1999).**Somatic Embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of citrus. *Plant Cell Reports*, 8, 935-940.
26. **Carimi F., De Pasquale F., Fiore S. et D'Onghia A.M. (2001).** Sanitation of Citrus germplasm by somatic embryogenesis and shoot tip grafting. In: Improvement of the citrus sector by the setting up of common conservati on strategies for the free exchange of healthy citrus genetic resources. Options Méditerranéennes B/33, *CIHEAM Publications*, 60-65.

27. **Carimi F. et De Pasquale F. (2003).** Micropropagation of Citrus. Micropropagation of Woody trees and fruits. *Kluwer Academic Publishers* (eds.), pp. 590-619.
28. **Carimi F. (2001).** Somatic embryogenesis and organogenesis in Citrus for sanitation and in vitro conservation. In: Improvement of the citrus sector by the setting up of common conservation strategies for the free exchange of healthy citrus us genetic resources. *Options Méditerranéennes B n°33, CIHEAM* (eds), pp.115-128.
29. **Carimi F. (2003).** Use of somatic embryogenesis in *Citrus* and *Vitis*. *Communication, seminaire, CIHEAM - IAM de BARI* le 17.06.2003
30. **Carimi F. (2005).** Somatic embryogenesis protocol: Citrus. In: S. MohanJain and Pramod K. Gupta (eds.), *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants, Forestry Sciences*, Springer, The Netherlands, 77: 321-343.
31. **Caruso A., Guardo G., Reforgiato Recupero G., Russo G. et Pietro Paolo D. (2000).** Viroid detection in citrus flowers and use of style culture as an alternative method in sanitation programs. *Proc. In : Intl. Soc. Citricult* , 110 – 111
32. **Carvalho A., Santos F.A. et Machado M.A. (2002).** Psorosis virus complex elimination from citrus by shoot-tip grafting associated to thermotherapy. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 306-308
33. **Cassells A.C., Doyle B.M. et Curry R.F. (2000).** Methods and markers for quality assurance in micropropagation. *Acta Horticulturae*, 530, p 43.
34. **Chakravarty B. et Goswami B.C. (1999)** Plantlet regeneration from long-term callus cultures of *Citrusacida* Roxb. and the uniformity of regenerated plants. *Sci. Hortic.* 82:159–169.
35. **Chapot H. (1955).** Systématique des Citrus en relation avec leur composition chimique. *Bull. Soc. Sci. Nat. Phys. du Maroc.* N°35.
36. **Chapot H. (1963).** La Clementine ‘Al Awania’, Rabat. (7) 1-34.
37. **Chatibi A., Kchouk M.L., Mliki A. et Ghorbel A. (1997).** Microgreffage du pistachier (*Pstacia vera* L) cv, mature. Ed.: option méditerranéennes. *CIHEAM publications*, Ed. Tunisie, Pp 121-130.
38. **Clark M.F and Bar-joseph (1984).** Enzyme immunosorbent assays in plant virology. In *Methods in virology*, VOL VII (Eds. Maramorsch, K and Koprowski, H.), pp. 52-85. Academic Press, New York
39. **Cole R.M., Tully J.G., Popkin T.J. et Bové J.M. (1973).** Morphology, ultrastructure and bacteriophage infection of the helical mycoplasma-like organism (*Spiroplasma citri* gen. nov sp. nov.) cultured from stubborn disease of citrus. *Journal of Bacteriology*, 115: 367-386.
40. **D'Onghia A.M., De Pasquale F., Carimi F., Savino V. et Crescimanno F.G. (1997).** Somatic embryogenesis from style culture as a possible means for virus elimination in Citrus. *J. Phytopathology* 145: 77-79.

41. **D'Onghia A.M., Savino V., Kyriakou A.P., Yilmaz M.A., Baloglu S., Stamo b., Khoury W., Boubker J., Drossopoulou J. et Abdel-Salam A.M. (1998).** Proposal of a schem for the production maintenance and utilization of citrus certified propagative material in the Mediterranean. In: *Proceedings of the Mediterranean Network on Certification of Citrus. .Option Mediterraneennes. Serie B 21, CIHEAM Pablication: 135-152.*
42. **D'Onghia A.M., Carimi F., De Pasquale F., Djelouah K. et Martelli G.P. (2000a).** Somatic embryogenesis from style and stigma: a new technique for the sanitation, conservation and Safe exchange of *Citrus* germaplasm. In: Proc. 19<sup>th</sup> ISC Congress (Florida 2000), 147-149.
43. **D'Onghia A.M., Djelouah K. et Savino V. (2000b).** Serological detection of Citrus psorosis in seeds but not in seedlings of infected mandarin and sour orange. *Journal. of Plant Pathology*, 82 (3):233-236.
44. **D'Onghia A.M., Djelouah K., Frasher D. et Potere O. (2001).** *Detection of Citrus psorosis virus by Direct Tissue Blot Immunoassay. Journal of Plant Pathology*, 83(1): 139-142.
45. **Da Graça J.V. et Korsten L. (2004).** Citrus huanglongbing: review, present status and future strategies. *Diseases of Fruits and Vegetables*, Volume I, pp 229-245
46. **Dalvesco L.L. et Guerra P.M. (2001).** The effectiveness of nitrogen sources in Feijoa somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64: 19 – 25
47. **Davino M. et Garnsey S.M. (1984).** Purification, characterization and serology of a mild strain of citrus variegation virus from Florida. In *Proc. 9 th. Conf. IOCV*, p.196-203. Riverside, IOCV.
48. **Davino M., Areddia R. et Garnsey S.M. (1988).** Distribution of Citrus Variegation Virus within Citrus Hosts. *Proceedings of the 10 th. Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*, Riverside. pp 322-326
49. **De Pasquale F., Carimi F. et Crescimanno F.G. (1994).** Somatic embryogenesis from styles of different cultivars of *Citruslimon* (L). *Brum. Aust. J. Bot.* 42: 587-594.
50. **De Pasquale F., Giuffrida S. et Carimi F. (1999).** Minigrafting of shoots, roots, inverted roots and somatic embryos for rescue of in vitro regenerants of *Citrus*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 124: 152-157.
51. **Demarly Y. et Sibi M. (1989).** Amélioration des plantes et Biotechnologie. Universités francophones de l'UREE John Libbey Eurotext Publisher, 152p.
52. **Derrick K., Lee R.F., Hewitt B.G. et Barthe G.A. (1993).** Spiroviruses : A new group of serologically diverse plant viruses: associated with Citrus psorosis and ringspot. In: *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, Riverside press: 428-42.
53. **Dhuique-Mayer C. (2007).** Evaluation de la qualité nutritionnelle des jus d'agrumes: estimation in vitro de la biodisponibilité des caroténoïdes. Thèse de doctorat, université de Montpellier II, 112 p.

54. **Djelouah K., Potere O., Boscia D., D'Onghia A.M. et Savino V. (2000).** Production of monoclonal antibodies to *Citruspsorosis* associated virus. *Proc. 14<sup>th</sup> Conf. of the Int. Org. of Citrus Virologists, IOCV*, Riverside, pp. 152-158.
55. **Djelouah K., Frasheri D. et D'Onghia A.M. (2002).** Serological diagnosis of Citrus psorosis virus (CPsV) and *Citrus tristeza virus* (CTV) using flower parts. In: *Proceedings 15<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside press*: 363-365.
56. **Doyle J.J. et Doyle J.L. (1990).** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
57. **Duran Vila, N., Ortega, V. et Navarro, L. (1989).** Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 16, 123-133.
58. **Duran Vila.N., Gogorcenna Y., Ortega V., Ortiz J et Navarro L. (1992).** Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb. Effect of temperature and photosynthetic radiations. *Plant Cell Tis. Org. Cult.*, 29, 11–18.
59. **Duran Vila.N., Pina J.A. et Navarro L. (1993).** Improved indexing of Citrus viroids. In: *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside press*: 202–211.
60. **EPPO (2003).** EPPO reporting service 2003-072, N°5, *European Plant Protection Organization* EPPO, Paris.
61. **Eshraghi P., Zarghami R., Ofoghi H. et Mirabdulbaghi M. (2005).** Somatic embryogenesis in two Iranian date palm cultivars. *AJB*. 4 (11):1309-1312
62. **F.A.O. (2008).** Les agrumes Examen du marché, sur la page de l'UNCTAD. <http://www.unctad.org/infocomm/francais/orange/marche.htm>
63. **Fang D.Q. et Roose M.L. (1997).** Identification of closely related Citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95:408–417
64. **Fawcett H.S. (1938).** Transmission of psorosis of citrus. *Phytopathology*, 28:669. (Abstract)
65. **Fawcett H.S. et Klotz L.J. (1984).** Bark shelling of trifoliolate orange, *California Citrographe*, 48: 230
66. **Féraud-Keller C, H. Espagnac H. (1989).** Conditions d'apparition d'une embryogénèse somatique sur des cals issus de la culture de tissus foliaires du chêne vert (*Quercus ilex*). *Canadian Journal of Botany*, 67( 4) : 1066-1070
67. **Flores R. (1988).** Detection of *Citrus exocortis viroid* in natural and experimental citrus hosts by biochemical methods. *Proceedings of the 10<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside press*: 192-196.
68. **Foissac X., Saillard C., Gandar J., Zreik L. et Bové J.M. (1996).** Spiralin polymorphism in strains of *Spiroplasma citri* is not due to differences in posttranslational palmitoylation. *J. Bacteriol.* 178: 2934- 2940.

69. **Fourie C.J. (1991).** Improved shoot-tip grafting of citrus. *Subtropical*, 12(3), 8-12.
70. **Garcia M.L., Sanchez de la Torre M.E., Dal Bo E., Djelouah K., Rouag N., Luisoni E., Milne R.G. and Grau O. (1997).** Detection of *Citrus psorosis- Ringspot virus* using RT-PCR and DAS-ELISA. *Plant Pathology*, n. 46: 830-836.
71. **Garnier M., Latrille J. et Bové J.M. (1976).** *Spiroplasma citri* and the organism associated with likubin : comparison of their envelope systems. *Proc 7<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of citrus virologists IOCV*. Riverside: 13-17.
72. **Garnier M. et Bové M. (1983).** Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. *Phytopathology*, 73, 1358-1363.
73. **Garnier M., Martin-Gros G., Bové J.M. (1987).** Monoclonal antibodies against the bacterial-like organism associated with citrus greening disease. *Annales de Microbiologie (Institut Pasteur)*, 138, 639-650.
74. **Garnier M. et Bové J.M. (1996).** Distribution of Huanglongbing (greening) liberobacter species in fifteen African and Asian countries. *Proc. of 13<sup>th</sup> Conf. Int. Org. Virologists, IOCV*. Riverside: 388-391
75. **Garnsey S.M., Permar T.A., Cambra M. et Henderson C.T. (1993).** Direct tissue blots immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). In: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists Riverside press*: 39-50.
76. **Germana M.N. (2005).** Protocol of somatic embryogenesis from *Citrus* spp. another culture. In: *Protocol of somatic embryogenesis in woody plants*, (eds) Springer, p 585.
77. **Grafton-Cardwell E. (2012).** Brown Citrus Aphid, *Toxoptera citricida*. Center for Invasive Species Research, University of California Riverside.
78. **Grant T. (1967).** Effect of heat treatments on tristeza and psorosis viruses in citrus. *Plant Disease Reporter*, 41: 232-234.
79. **Grosser JW., Chandler JL. et Gmitter FG. (2003).** Development of improved sweet oranges via somaclonal variation. *Proc Int Soc Citriculture*, pp 42-45
80. **Guerri J., Peña J.A., Vives M.C., Navarro L. et Moreno P. (2004).** Seed transmission of *citrus leaf blotch virus*: Implications in quarantine and certification programmes. *Plant Disease*, 88:906
81. **Hadgson R.W. (1967).** Horticultural varieties of citrus In: *The Citrus industry*. Ed Reuther, webber et batchelor. Univ. Calif. Agri. Sci. Berkeley. pp 431-588.
82. **Hume H.H. (1957).** Citrus fruits. The Mac Millan company, New Work. pp 260-282.
83. **Imbert E. (2008).** Le dragon jaune sort ses griffes. **Revue FruiTrop, N°161.**

84. **Iraqi D., Lamhamedi M.S. et Tremblay F.M. (2005).**Rôle et métabolisme du saccharose lors de l'embryogenèse somatique : cas de l'épinette.*AL AWAMIA* 113 Vol.2 N°1. pp 63-76
85. **INRA (2006).**Rapport National sur l'état des Ressources Phytogénétiques pour l'Alimentation et l'Agriculture Juin 2006. 67p
86. **ITAF (2003).** Rapport sur le dépistage du *Citrustristezaclosterovirus* (CTV) au niveau du parc à bois agrumicole. ITAFV, CNCC, INPV. Ministère de l'Agriculture, Alger 2003, Algérie.
87. **Jain S.M. et Gupta P.K. (2005)** .Protocols of somatic embryogenesis-Woody Plants, Kluwer Aca-demics publishers.547 pp.
88. **Jagoueix S., Bové J.M. et Garnier M. (1994).**The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 379-386.
89. **Jagoueix S., Bové J.M. et Garnier M. (1996).** Detection of two *Candidatusliberibacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecr Cell Probes*, 10 :43-50
90. **Jimenez V.M. (2001).** Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13,196-223.
91. **Kaeppler S.M., Phillips R.L. et Olhoft P. (1998).**Molecular Basis of Heritable Tissue culture-induced Variation in Plants. Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement. 465-484.
92. **Kaeppler S.M., Kaeppler H.F. et Rhee Y. (2000).** Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* , 43: 179-188.
93. **Karboa M. (2001).** L'agrumiculture en Algérie. *Option méditerranéenne* n°43. Ed: CIHEAM. pp 21-26.
94. **Karp A. (1989).** Can genetic instability be controlled in plant tissue culture? *Newsletters-IAPTC*, 58: 2-11.
95. **Karp A. (1991).** On the current understanding of somaclonal variation. *Oxf Surv. Plant Mol. Cell. Biol.*, 7: 1-58.
96. **Kerboua M., Benbadis A. et Assabah A. (2001).**Mediterranean project of improvement of the citrus sector in the Mediterranean by setting up common conservation strategies for the free exchange of healthy citrus plant genetic resources. *Options Méditerranéennes, B /33* . CIHEAM Publication: 151-156.
97. **Kohlenbach, H.W. (1977).** Basic aspect of differentiation and plant regeneration from cell and tissue culture and its biotechnological application, *Springer* (eds), 355-366.
98. **Kobayashi, S. (1987).** Uniformity of plants regenerated from orange( *Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. *Theor Appl Genet* 74:10-14

- 99. Krueger R., Kahn T.L., Gumpf D.F., Balance P., Bier O.J. et Bash J.A. (2003).** Shoot-tip micrografting for rescue or therapy of field-grown citrus germplasm accessions, *Proc. 19<sup>th</sup> ISC Congress* (Florida 2000) (Abstract).
- 100. Kuperman F.M. (1984).** Plant morphophysiology, *Moscow: Vysshaya shkola*, pp. 39–77.
- 101. Labroussaa F., Dubrana M.P., Bouvery N. et Saillard C. (2008).** Mise en évidence chez la cicadelle *Circulifer haematoceps* de protéines potentiellement impliquées dans la transmission de *Spiroplasma citri*. 8<sup>ème</sup> Rencontres plantes-bactéries. INRA, centre de recherche d'Angers.
- 102. Labroussaa F. (2010).** Interactions entre le *Spiroplasma citri* et son insecte vecteur *Circulifer haematoceps*. La phosphoglycérate kinase de *S. citri* : une “actin-binding protein” impliquée dans la transmission du spiroplasma par la cicadelle. Thèse. Bordeaux (FRA) : Université Bordeaux 2. 159 p.
- 103. Larbi D., Ghezli C. et Djelouah K. (2009).** Historical review of *Citrustristeza virus* (CTV) in Algeria. *Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus*: a serious threat to the Mediterranean citrus industry Option Méditerranéenne, *CIHEAM publications*, S64: 107-110.
- 104. Larkin, P. J. et Scowcroft, W. R., (1981).** Somaclonal variation- novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60: 197-214.
- 105. Lebdi Grissa K. (2010).** Etude de base sur les cultures d'agrumes et de tomates En Tunisie . Regional Integrated Pest Management Program in the Near East. *Workshop*, pp 13-14
- 106. Lee R.F., Roistacher C.N., Niblett C.L., Lastra R., Rocha-pena M., Garnsey S.M., Yokomi R.K., Gump DJ. et Dodds J.A. (1992).** Presence of *Toxoptera citricidus* in central America: a threat to citrus in florida and the United States. *Citrus Ind.*, 73: 13-24.
- 107. Lin KH. et Lo H.H. (1965).** A preliminary student on thermotherapy of yellow shoot of citrus. *Acta Phytopylacica Sinicia* 4(2): 169-175
- 108. Litz R.E., Moore G.A. et Srinivasan C. (1985).** *In vitro* system for propagation and improvement of tropical fruit and palm. *Hort. Rev.*, 7, 157-200
- 109. Loconsole G., Castellano M.A., Dell'Orco M., Boscia D. et Savino V. (2006).** Serological detection of *Citrus psorosis virus* using a polyclonal antiserum to recombinant virus using a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. *Journal of plant pathology*, 88: 171-173.
- 110. Loconsole G., Saponari M. et Savino V. (2010).** Development of real-time PCR based assays for simultaneous and improved detection of Citrus viruses. *Plant Pathology*.
- 111. Loeillet D. (2008).** Les marchés mondiaux. Agrumes et jus d'orange. Ed : Economica. Paris. Pp 350-354.
- 112. Loussert R. (1989).** Les agrumes. Arboriculture Méditerranéenne. Tome1. Ed. Tec et Doc. Paris, 136p.

- 113.Lovisol O. (1993).** Agro-ecology and centres of origin of graft-transmissible diseases of citrus. *Proc. 12th. Conf. of Int. Org. of citrus virologists IOCV*. Riverside pp 406-411
- 114.MADR (2009).**Le Ministère de l'*Agriculture* et du Développement Rural .La Direction des statistiques Agricoles et des Systèmes d'Information MADR. Algérie
- 115.MADR (2011).** Le Ministère de l'*Agriculture* et du Développement Rural (**MADR**) Bilan de la production agrumicole.La Direction des statistiques Agricoles et des Systèmes d'Information MADR. Algérie
- 116.Martín S., Alioto D., Milne R.G., Garnsey S.M., GarcíaM.L., Grau O., Guerri J. et MorenoP. (2004).** Detection of *Citruspsorosis* Virus by ELISA, Molecular Hybridization, RT-PCR and Immunosorbent Electron Microscopy and its Association with *Citruspsorosis* Disease.[\*European Journal of Plant Pathology\*. 110 \(7\): 747-757.](#)
- 117.Martins M., Sarmiento D. et Olivier M.M. (2004).** Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plants Cell Rep* .23:492-496.
- 118.Masker A. (1987).** Etat actuel du verger agrumicole et perspectives de développement. MAP-ITAFV, *1er Séminaire National sur les Agrumes*, Chlef 2-4 mars 1987.
- 119.Meins F., J.R. et Binns A. (1977).**Epigenetic variation of cultured somatic cells: evidence for gradual changes in the requirement for factors promoting cell division. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA*, 74: 2928-2932.
- 120.Meziane M. (2006).** Improvement of protocols for *CitrusPsorosisvirus* (CPsV) elimination and *in vitro* virus conservation. Thèse de Master, CIHEAM. Institut Agronomique Méditerranéen de Bari. Italie. 59 p
- 121.Miao H., Seyran M., Garcia J.V. et Svaria M. (2005).**Preliminary observations on a possible association between *Citruspsorosis* virus and Olpidium- like fungus on citrus in texas. In *Proceedings of the 16<sup>th</sup> Conference of International Organization of the Citrus Virologists*, (abstract).
- 122.Milne R.G., Garcia M.L. et Grau O. (2000).** Genus *Ophiovirus*. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens F., Estes M.K., Lemon S., Maniloff J., Mayo M.A., Mc Geoch D., Pringle C.R., Wickner R.B. (Eds). *Virus taxonomy*. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses, Academic press, San Diego: 627-631.
- 123.Mink G.I., Wample R. et Howell W.E. (1998).** Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses, and viroids While Maintaining Plant Survival. In: *Plant Virus Disease control. American Phytopathological Society*, 332-345.
- 124.Mouras, A. et Lutz, A., (1980).**Induction, repression et conservation des propriétés embryogénétiques des cultures de tissus de carotte sauvage. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 127: 93-98.
- 125.Murashige T. et Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-479.

- 126. Murashige T., Bitters W.P., Nauer E.M. et Roistacher C.N. (1972).** Technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus free Citrus. *Int citrus symp.* N°3. pp 1155-1161.
- 127. Mutin, G.(1969).** L'Algérie et ses agrumes In: Revue de géographie de Lyon. Vol. 44 n°1, 1969. pp. 5-36
- 128. Nauer E.M., Roistacher C.N., Carson T.L. et Murashige T. (1983).** *In vitro* shoot-tip grafting to eliminate Citrus viruses and virus like pathogens produces uniform budlines. *Horticulture Science*, 18(3), 308-309.
- 129. Navarro L., Roistacher C.N. et Murashige T. (1975).** Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus free citrus. *Ed. American Society for Horticultural Science*, 100, p 471-479.
- 130. Navarro L., Jaurez J., Ballester J.F et Pina J.A. (1980).** Elimination of some citrus pathogens producing psorosis-like leaf symptoms, by shoot-tip grafting *in vitro*. *Proc. 8<sup>th</sup>. Conf. Int. Organ Citrus virologists*, IOCV Riverside :162-166
- 131. Navarro L. (1981).** Citrus shoot-tip grafting *in vitro* and its application: a review. *Proc.Int. Citriculture*, 1, 452-456.
- 132. Navarro L., Civerolo E.L., Juarez J et Garmsey S.M. (1984).** Therapy and citrus improvement. Improving therapy methods for citrus germplasm exchange. *Proc. 9<sup>th</sup>. Conf. of Int. Org. of Citrus Virologists*. IOCV Riverside: 400-408.
- 133. Navarro L., Ortiz J.M et Juarez J. (1985).** Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured *in vitro*. *Hort. Science*, 20:214–215.
- 134. Navarro L. (1988).** Application of shoot-tip grafting *in vitro* in woody species. *Acta Horticulturae*, 227, 43-55.
- 135. Navarro L., Civerlo E.L., Juarez S et Garnsey S.M. (1991).** Improving Therapy Methods for Citrus Germplasm Exchange. *In Proc. 11<sup>th</sup>. Conf. IOCV* ( Florida 1989), Riverside CA , 400-408.
- 136. Navarro L., Pina J.A., Juarez J. et Ballester-Olmos J. F. (1993).** Elimination of a bud-union abnormality of sweet orange grafted on rough lemon by shoot tip grafting *in vitro*. *In: Proc.12<sup>th</sup>. Conf. IOCV*. (India 1992), Riverside CA, 375-378.
- 137. Navarro L. (2000).** Working group on utilisation of citrus germplasm: Introduction to Working Group on Utilization of Citrus Germplasm. In: Proceedings of the Global Citrus Germplasm Network, 19-20. [http://www.crec.ifas.ufl.edu/societies/ISC/gcgn/GCGN\\_Program\\_complete](http://www.crec.ifas.ufl.edu/societies/ISC/gcgn/GCGN_Program_complete).
- 138. Nicotra A. (2001).** Hybrides de type mandarine présentant un intérêt récent pour la consommation à l'état frais. Problèmes et moyens de contrôle. *Symposium sur les agrumes Chine/FAO*.
- 139. Nieto-Nafria, J. M., Alonso –Zarazaga., M. A., et Pérez Hidalgo., N. (2005).** *Toxoptera citricida* or *Toxoptera citricidus* ? The validity of a specific name (Hemiptera, Aphididae, Aphidini). *Graellsia* 61: 141-142.

- 140. O'Brien I.E.W., Smith D.R., Gardner R.C. et Murray B.J. (1996).** Flow cytometric determination of genomic size in Pinus. *Plant Science*, 115, 91-99.
- 141. OEPP/CABI (1996).** *Diaphorina citri*. Fiches informatives OEPP sur les organismes de quarantaine. N°90.
- 142. Oldfield G.N. (1988).** Ecological associations of *Spiroplasma citri* with insects, plants and other plant mycoplasmas in the western United States. In: *Mycoplasma diseases of crops. Basic and applied aspects* (Ed. by Maramorosch, K.; Raychaudhuri, S.P.), pp. 175-191.
- 143. Ollitalu (1992).** Le greffage d'embryons : une technique prometteuse pour les programmes d'amélioration des agrumes. *Fruits*, **47** (spéc. Agrumes) : n. spécial..
- 144. Owens R.A. et Diener T.O. (1981).** Sensitive and rapid diagnosis of Potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science*, 213: 670-672.
- 145. Palacio-Bielsa A., Foissac X et Duran-Vila N. (1999).** Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. *Eur. J. Plant Path.*, 105: 897-903.
- 146. Peña L., Cervera M., Fagoaga C., Romero J., Juárez N.J., Pina J.A. et Navarro L. (2007).** Citrus. Biotechnology in agriculture and forestry. *60 Transgenic crops*, Volume 5, ed. T Nagata ; H. Lorz and JM. Widholm.
- 147. Peshke V.M., Phillips R.I. et Gengenbach B.G. (1991).** Genetic molecular analysis of tissue culture derived Ac elements. *Theor. Appl. Genet.*, 82: 121-129.
- 148. Phillips R.L., Kaeppler S.M. et Peshke V.M. (1991).** Do we understand somaclonal variation? In: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology* Nijkamp, H.J.J., Van Der Plas., L.H.W. et Van Aartrijk, J. (eds.), Kluwer Academie, Amsterdam: 131-142.
- 149. Planet P., Jagoueix S., Bové J.M et Garnier M. (1995).** Detection and characterization of the African citrus greening liberobacter by amplification, cloning, and sequencing of the rplKAJL-rpoBC operon. *Current Microbiology*, 30, 137-141.
- 150. Praloran J.C. (1971).** Les agrumes. *Techniques Agricoles et productions Tropicales*. Ed. G.P. Maisson neuve et Larose. 565p.
- 151. Quashie A.M.L. et Koukou K. (2009).** Culture *in vitro* et herbier. *Ann. Univ. Lomé* (Togo), série Sciences, Tome XVII : 49-58.
- 152. Rahman MH., Zaher M., Mazid M. A., Haque, M. Z. et Mahata S. C. (1996).** Replacement of costly fish meal by silkworm pupae in diet of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 39 : 64-67.
- 153. Rahman MH et Rajora OP. (2001).** Microsatellite DNA somaclonal variation in micropropagated trembling aspen ( *Populus tremuloides* ) *Plant Cell Rep* 20:531-536
- 154. Rebour (1945).** Union des syndicats des producteurs d'agrumes, 502 pages
- 155. Rebour H. (1948).** La culture des agrumes en Algérie. Documents algériens. *Série économique. Agrumiculture*. N° 49, 4p.

- 156.Reichert I. et Hellinger E. (1930).**Internal decline. A new physiological disease of citrus fruits in Palestine. *Hadar*, 3: 220-224.
- 157.Reinert J (1959).** Uber die kontrolle der morphogenese and die inductionVon Advientive, embryonen & Gewebekuluren aus kartten. *Planta* 58: 318-333.
- 158.Ricci A.P., Mourao Ffillho F.A.A., Mendes B.M.J. et Piedade S.M.S. (2002).** Some embryogenesis in *Citrus senensis*, *C. reticulata* and *C. Nobilis x C. deliciosa*. *Ed. Scientia Agricola*, 59(1), p 41-46.
- 159.Rizza S., Nobile G., Tessitori M., Catara A. et Conte E. (2008).**Real Time RT-PCR assay for quantitative detction of *Citrus viroid III* in plant tissues.
- 160.Rodríguez A., Gorri, M.T., Serra J., Román M.P., Collado C., Giménez P., Bertolini E., Hermoso de Mendoza A., et Cambra M. (2005).** Estimation of the Number of Citrus tristeza virus-Viruliferous Aphids Landing on Individual Citrus Seedlings and Viral Incidence in Different Citrus Rootstocks in Spain.*Sixteenth IOCV Conference*.Short Communications.
- 161.Roistacher C.N. et Calavan E.C. (1972).**Heat tolerance of preconditioned citrus budwood for virus inactivation: *In Proc. 5<sup>th</sup> Conf. IOCV*. Gainesville, 256-61.
- 162.Roistacher C.N., Blue R.L. et Calavan E.C. (1973).**A new test for Citrus cachexia. *Citrograph*, 58: 261-262.
- 163.Roistacher C.N., Calavan E.C., Blue R.L., Navarro L. et Gonzales R. (1977).** A new more sensitive citron indicator for the detection of mild isolates of *Citrus exocortis* viroid (CEVd), *Plant Disease Reporter*, 61: 135-139.
- 164.Roistacher C.N. (1988).***Citrus tatterleaf virus*: further evidence for a single virus complex. *In Proceedings of the 10<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, Riverside press: 353-359.
- 165.Roistacher C.N. (1991).** Graft transmissible disease of citrus. *Handbook for Detection and Diagnosis*. FAO (eds), Rome, p286
- 166.Roistacher C.N. (1993).** Psorosis. In: *Proc. 12<sup>th</sup> Conf. IOCV* (India 1992), Riverside CA, 139-154.
- 167.Roistacher C.N. (1995).** A historical review of the major graft transmissible disease citrus. FAO. Ed. Rome, p 89.
- 168.Roistacher C. N., D’Onghia A. M. et Djelouah K. (2000).**Defining psorosis by biological indexing and ELISA. In: da Grac, a J. V., Lee R. F. And Yokomi R. H. (eds). *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (IOCV), Riverside, California, USA: 144-151.
- 169.Roistacher C.N. (2010).** La tristeza des agrumes.EcoPort slide shows [www.ecoport.org](http://www.ecoport.org)
- 170.Ruggieri G. (1955).** Le arance impietrate. *Riv. Agrumic.*, 1(2): 65-69.

- 171.Sadok B. (1983).** Morphogenèse et possibilités nouvelles de multiplication végétative *in vitro* chez les citrus .thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, université de Tunis.136 p.
- 172.Saglio P., Laffèche D., Bonisol C. et Bové J.M. (1971).** Culture *in vitro* des mycoplasmes associés au stubborn des agrumes et leur observation au microscope électronique. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences-Paris*, 272: 1387-1390.
- 173.Saillard C. et Bové J.M. (1983).**Application of ELISA to spiroplasma detection and classification. In: *Methods in mycoplasmaology* (Ed. by Razin, S.; Tully, J.G.), Vol. 1, pp. 471-476. Academic Press, New York, Etats-Unis.
- 174.Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T. (1989).**Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, Cold Spring.
- 175.Sané D. (1998).** Etude des facteurs physiologiques et cytogénétiques de l'embryogenèse somatique chez *Acacia nilotica* (L.) [Willd. ex] *Del. ssp. tomen tosa* Brenan, *Acacia nilotica* (L.) [Willd. ex] *Del. ssp. adstringens* Brenan et *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne ssp. *raddiana* (Savi) Brenan. Thèse Doct. de 3<sup>ème</sup> cycle de biologie végétale. Univ. Cheikh ANTA DIOP-DAKAR.
- 176.Sano T., Kudo H., Sugimoto T. et Shikata E. (1988).** Synthetic oligonucleotide hybridization probes to diagnose hop stunt viroid strains and Citrus exocortis viroid. *Journal of Virological Methods*, 19: 109-119.
- 177.Semancik J.S. (1988).** Citrus Exocortis Disease 1976 to 1986. In: *Proc. 10<sup>th</sup>. Conf. IOCV*, Riverside, University of California, 136-151.
- 178. Sihachakr D., Cavalcante-Alves J M., Tizroutine S., Allot M., Mussio I., Servaes A., Nzoghe D.et Ducreux G.(1994).** Embryogenèse somatique chez la patate douce(*Ipomoea batatas*(L).Lam) : Caractérisation et régénération des plantes. Quel avenir pour l'amélioration des plantes. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris D: 251-261.
- 179.Siminovitch L. (1976).** On the nature of heritable variation in cultured somatic cells. *Cell* 7: 1-11.
- 180.Siragusa M., Carra A., Salvia L., Puglia AM., De Pasquale F. et Carimi F. (2007).** Genetic instability in calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenylurea derivatives.*Plant Cell. Rep.* 26:1289-1296.
- 181.Su Hong-Ji et Jan-Yang Chu (1984).** Modified technique of citrus shoot-tip grafting and rapid propagation method to obtain citrus bud-woods free of citrus viruses and likubin organism. In: *Proc. Int. Org. Citriculture*, 2: 332-333.
- 182.Swingle W.T. (1948).** The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. In: *citrus industry*. Chap IV. Univ. Calif. Press, Berkeley and Los Angeles.
- 183.Takahara T., Okudai N. et Kuhara S. (1986).**Elimination of citrus viruses by semi-micrografting. *Kuchinotsu: Fruit Tree Research Station*, (8), 13-24.

- 184. Taleb A. (1974).** L'état sanitaire des agrumes en Algérie. Compte rendu de la réunion scientifique sur la sélection sanitaire des agrumes. *Comité Maghrébin des agrumes et primeurs, commission agro technique*. Alger 1971.
- 185. Tan X.L. et Qian Y.G. (1988).** Effect of explants sources and cultural condition on plant regeneration on *Gossypium gossypoides*. *Acta genet.sin.* n° 15(2), p 473-497.
- 186. Tanaka T. (1954).** Species problem in Citrus. *Japanese Society for Promotion of Science*, Tokyo, Japan.
- 187. Tisserat B., Esane B. et Murashige T. (1979).** Somatic embryogenesis in Angiosperms. *Hort. Rev.*, 1: 1-78.
- 188. Trabut L. (1908).** L'arboriculture dans le Nord de l'Afrique (suite). *Revue Horticole d'Algérie*, n°1 (janvier) : 1-13.
- 189. Trabut L. et Marès R. (1906).** L'Algérie Agricole en 1906. Ed. Direction de l'agriculture. 543 p.
- 190. Trabut M. (1913).** A note. In *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, Paris, 156: 243-244.
- 191. Tremblay L., Lamhamedi M.S et Colas F. (2007).** État actuel de l'intégration à l'échelle opérationnelle de l'embryogenèse somatique des conifères au Québec. Résumé d'une conférence présentée lors du Colloque sur la ligniculture. *Congrès de l'Acfas*. 8 et 9 mai 2007. Trois-Rivières, Québec. p. 13.
- 192. Tripathi L. et Tripathi J.N. (2003).** Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, ; 2 (2): 243-253C.
- 193. Vardi A., Frydman-Shani A., Galun E., Gonem P. et Belichmans S. (1990).** Citrus cybrids transfer of microcitrus organelles into-citrus cultivars. 1<sup>st</sup> International symposium *in-vitro* culture and horticultural breeding, *Acta Horticulturae*, 280: 234-239.
- 194. Vernière C. (2003).** Organisme nuisible: Hop stunt viroid (HSVd-c). Analyse du Risque Phytosanitaire. (ARP) Référence: AGR-v 1. *Réunion CIRAD*.
- 195. Villechanoux S., Garnier M., Renaudin J. et Bové M. (1992).** Detection of several strains of the bacterium-like organism of citrus greening disease by DNA probes. *Current Microbiology*, 24, 89-95.
- 196. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.V., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. et Zabeau M. (1995).** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nu-cleic. Acids Res.*, 23: 4407-4414.
- 197. Wagneur W. (1973).** Classification et description des espèces et variétés ; agrumes, olivier, prunier, noyer. Polycope, Mai 1973.
- 198. Wang X., Zhou K., Tang K., Zhou Y. et Li Z. (2009).** A rapid one –step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in china. *Journal of Plant Pathology*, 124: 175-180.

- 199. Webber HJ. (1943).** Cultivated varieties of citrus. The citrus industry. Ed.: H.J. Webber et I.D. Batchelor. *Univ. Calif. Press, Berkeley.*, (1) 475-668.
- 200. Xiao JP., Chen LG., Xie M, Liu HL, Ye WQ. (2009).** Identification of AFLP fragments linked to seedlessness in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and conversion to SCAR markers. *Scientia Horticulturae*. 121: 505–510.
- 201. Yang X., Hadidi A. et Garnsey S.M. (1992).** Enzymatic amplification of Citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology*, 82: 279-285.
- 202. Yokomi R.K., Mello A.F.S., Saponi M. et Fletcher J. (2008).** Polymerase chain reaction –based detection of *Spiroplasma citri* associated with *Citrus stubborn* disease. *Plant Disease*, 92: 253-260.

# Publications

# Annexes



				épinastie des jeunes feuilles									
	Lunario	-	-	Epinastie des jeunes feuilles et Brunissement des nervures médianes	-	+	-	-	+	+	+	-	
	Poire de Commandeur	-	-	Retarde de croissance et épinastie des jeunes feuilles	-	-	-	-	-	-	+	-	
<i>C.sinensis</i> (L.) <i>Osbeck</i>	Alger Navel	Malformation des feuilles	Eclaircissement des nervures et enroulement des feuilles	Epinastie des jeunes feuilles et Brunissement des nervures médianes	Feuille mouchetée et marbrure	+	+	-	+	-	-	-	
	Djirid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Double fine améliorée	-	Eclaircissement des nervures des feuilles		Marbrure des feuilles	+	+	-	-	-	-	-	
	Golden Bucky	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Maltaise de Tunisie		Eclaircissement des nervures des feuilles	-	-	+	+	+	+	+	+	-	
	Oranger de bey	-	-	Epinastie des jeunes feuilles	-	-	-	-	+	-	-	-	
	Oranger de Blida		Eclaircissement des nervures des feuilles	Retarde de croissance et épinastie des jeunes feuilles		+	-	-	+	-	-	-	
	Orangersidi Ali	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	S de Biskra	-	-	Retarde de croissance et épinastie des jeunes feuilles	-	-	-	-	+	+	-	-	
	Shamoutistation	-	Bombement et éclaircissement des nervures des	Retarde de croissance et épinastie des jeunes feuilles et léger	Feuille mouchetée et	+	+	-	+	+	+	-	

			feuilles	brunissement du pétiole	marbrure								
	ShamoutiSkik da	-	Eclaircissement des nervures	-	Feuille de chêne	+	+	-	-	-	-	-	-
	Thomson navel	-	-	Epinastie des jeunes feuilles	Feuille de chêne	-	+	-	--	-	-	-	-
	Washington Navel	Panachure et frisolée sur feuille	Bombement et éclaircissement des nervures des feuilles	Retarde de croissance et épinastie des jeunes feuilles	Feuille mouchetée, marbrure et feuille de chêne	+	+	+	-	-	-	-	-
<b><i>C. maxima</i></b> <b>(Burm.)</b> <b>Merrill</b>	PoméloRoyal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pomelo Ruby	Décoloration des feuilles	-	-	Feuille de chêne	-	+	-	-	-	-	-	-
<b><i>C. paradisi</i></b> <b>Macfad</b>	Pamplemoussier à chaire rose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pamplemoussier commun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>C. reshni</i></b> <b>Hort. ex</b> <b>Tan</b>	Cleopatra mandarin	-	-	Epinastie des jeunes feuilles	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b><i>C. reticulata</i></b> <b>Blanco</b>	Mandarine de Blida					-	-	-	-	+	-	-	-
	Mandarine Temple	-	-	Epinastie des jeunes feuilles	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	Pam Américain	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

## Annexe 2

**Tableau :** Composition des différents tampons utilisés en tests sérologiques (Clark et Bar-Joseph, 1984)

<b>Tampon</b>	<b>Composition</b>	<b>Quantité</b>	<b>Remarque</b>
<b>Phosphate buffer saline (PBS) 1x, pH 7.4</b>	NaCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaN <sub>3</sub> KCl	8.0 g 0.20 g 1.15 g 0.20 g 0.20 g	<b>Dissoudre dans 1 L d'eau distillée</b>
<b>Tampon de lavage pH 7.4</b>	PBS 1x Tween-20	1L 0.5 ml	
<b>Tampon d'extraction pH 7.4</b>	Polyvinylpyrrolidone Tween-20	20.0 g 0.5 ml	<b>Dissoudre dans 1 L PBS 1x</b>
<b>Tampon de fixation pH 9.6</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> NaN <sub>3</sub> NaHCO <sub>3</sub>	1.59 g 2.93 g 0.20 g	<b>Dissoudre dans 1 L d'eau distillée</b>
<b>Le Conjugué pH 7.4</b>	Polyvinylpyrrolidone Tween-20 Bovine serum albumin (BSA)	20.0 g 0.5 ml 2.0 g	<b>Dissoudre dans 1 L PBS 1x</b>
<b>Solution de substrat pH 9.8</b>	Diethanolamine NaN <sub>3</sub>	97 ml 0.20 g	<b>Dissoudre dans 1 L d'eau distillée</b>

## Annexe 3

### Tampon CTAB

Composition	Quantité
CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)	2%
TrisHCl [pH=8	20 mM
EDTA	20 mM
NaCl	1.4 M
$\beta$ -mercaptoethanol	0.2%
proteinase K	0.1 mg/mL

### Tampons et solutions utilisés pour préparer gel Agarose

Tampons	Composition	Quantités	Remarque
<b>TAE 10% (pH 7.2)</b>	Tris Acétate de Sodium EDTA	0.4 M 0.4 M 0.02 M	Ajustement du pH avec de l'acide acétique, stérilisation par autoclavage
<b>TBE 10X (pH 8.3)</b>	Tris Acidborique 99.5% EDTA	1 M 61.3 g 0.01 M	Dissoudre dans 1 L d'eau distillée, stérilisation par autoclavage
<b>TE (pH 8)</b>	Tris EDTA	10 mM 1 mM	stérilisation par autoclavage

## Annexe 4

### *Préparation du Milieu de culture Murashige et skoog( 1962)*

#### *Macro et micro-éléments : Préparation de 500 ml de solution mère ( 100X)*

Constituants	Quantité g\ 500ml solution	Solution	Conservation
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82.5	<b>A</b>	<b>Température ambiante</b>
KNO <sub>3</sub>	95.0		
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	18.5		
MnSO <sub>4</sub> - 4H <sub>2</sub> O	1.12		
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.43	<b>B</b>	<b>4°C</b>
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	0.00125		
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	22.0		
KI	0.0415	<b>C</b>	<b>4°C</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.5		
CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0.00125		
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.31	<b>D</b>	<b>4°C</b>
NaMoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	0.0125		
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1.392	<b>E</b>	<b>4°C</b>
EDTA	1.865	<b>F</b>	<b>4°C</b>

Les solutions préparées sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 mn

#### *Les vitamines*

Préparation de 100 ml de solution vitamines (1000X)

	Vitamine	Quantité (g)
Les	Tiamine(B <sub>1</sub> )	0.010
	Nicotinic Acide(B <sub>2</sub> )	0.050
	Myo-Inositol	10.000
	Glycine	0.200

vitamines sont dissoutes dans 50 ml d'eau distillée(Chauffées à 60°C). L'eau distillée est ajoutée à 100 ml du volume final et stérilisée par filtration à travers un filtre millipore

***Étapes de préparation du Milieu de culture Murashige et skoog***

1. Mettre dans un bicher de 1L 500 ml d'eau distillée.
2. Ajouter 10 ml de chaque des 6 solutions (A-F).
3. Ajouter 1 ml de vitamine (1000X)
4. Ajouter 50 g de saccharose
5. Ajouter l'hormone de croissance (si nécessaire)
6. Ajouter L'eau distillée a 1 litre du volume final
7. Ajuster le PH a 5.7 avec 0.5M HCl ou KOH
8. Transférer le milieu dans un Erlenmeyer de 1 litre
9. Ajouter 8 g d'Agar
10. Stérilisation pendant 20 mn à 120 °C
11. Répartition du milieu de culture dans des boites de Pétri (25ml\100mm Ø)

## Annexe 5

**Tableau :** Pourcentage de callogénèse des explants de *C.sinensis*, les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  ecartype

Espèce	Génotype	Callogénèse (%)
<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Washington navel (WN)	83,33 $\pm$ 4,17
	Metidja navel	100 $\pm$ 5
	Orange de Bey (OBy)	75 $\pm$ 3,75
	Double fine améliorée (DA)	94,5 $\pm$ 4,73
	Thomson navel (TN)	71,42 $\pm$ 3,57
	Alger navel (AN)	90,29 $\pm$ 4,51
	Oranger Sidi Ali (OSA)	80 $\pm$ 4
	Oranger de Blida (OB)	100 $\pm$ 5
	Shamouti station (CST)	100 $\pm$ 5
	Shamouti Skikda (CSK)	91,66 $\pm$ 4,90
	Djirid (DJ)	80 $\pm$ 4
	Sanguine de Biskra (SB)	70 $\pm$ 3,5
	Golden bucky (GB)	32,14 $\pm$ 1,61
Maltaise de Tunisie (MT)	44,44 $\pm$ 2,22	

**Tableau :** Pourcentage de callogénèse des explants de *C. reshni*Hort. ex Tan et *C. reticulata* Blancoles valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  ecartype

Espèce	Génotype	Callogénèse (%)
<i>C. reshni</i> Hort. ex Tan	Cleopatra mandarin(MC)	15,38 $\pm$ 0,77
<i>C. reticulata</i> Blanco	Pam Américain (PA)	43,33 $\pm$ 2,17
	Mandarinede Blida (MB)	62,33 $\pm$ 3,12
	Mandarine Temple(MT)	75 $\pm$ 3,75

**Tableau :** Pourcentage de callogénèse des explants de *C.sinensis**C. paradisi* Macf, les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  ecartype

Espèce	Génotype	Callogénèse (%)
<i>C. paradisi</i> Macf	Pamplemoussier à chaire rose(PCR)	76,47 $\pm$ 3,82
	Pamplemoussier commun (PC)	60 $\pm$ 3,00

**Tableau :** Pourcentage de callogénèse des explants de *C. maxima*(*Burm.*) Merrill, les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  ecartype

Espèce	Génotype	Callogénèse (%)
<i>C. maxima</i> ( <i>Burm.</i> ) Merrill	Pomélo Royal (PR)	66,66 $\pm$ 3,33
	Pomélo Ruby(Pb)	100 $\pm$ 5

**Tableau :** Pourcentage d'embryons somatiques formés à partir des explants de *C.sinensis*, les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  ecartype

Espèce	Génotype	Embryogénèse (%)
<i>C.sinensis</i>	Washington navel (WN)	30 $\pm$ 1,50
	Metidja navel	6,6 $\pm$ 0.33
	Sanguine de Biskra (SB)	40 $\pm$ 2,00
	Double fine améliorée (DA)	2,35 $\pm$ 0,12

**Tableau :** Pourcentage d'embryons somatiques formés à partir des explants de *C.limon*, les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  écartype

<b>Espèce</b>	<b>Génotype</b>	<b>Embryogénèse (%)</b>
<b><i>C.limon</i></b>	Lisbone 16	34,78 $\pm$ 1,74
	Lisbone 6	13,46 $\pm$ 0,67
	Lunario	15,78 $\pm$ 0,79
	Eureka	2,43 $\pm$ 0,12
	Eureka maroc	19,42 $\pm$ 0,97
	Bornéo	13,15 $\pm$ 0,66
	Dellys	17,85 $\pm$ 0,89
	Femmenillo	80 $\pm$ 4,00