

## Microgreffage d'apex de trois clônes d'oranger du cultivar Washington Navel

F. Abed

INRAA, Laboratoire de Physiologie Végétale, CRP Mehdi Boualem BP 37, Baraki 16210, Alger

**Résumé** - L'étude a concerné le microgreffage d'apex de trois clônes de l'oranger Washington Navel (clônes 39, 205 et 141) sur le porte greffe Citrange Troyer afin d'obtenir des plantes indemnes de virus. Le microgreffage des apex s'effectue sur des plantules issues de graines du porte greffe Citrange Troyer germées «in vitro», à l'obscurité totale et âgées de deux semaines. Un taux de réussite du microgreffage de 30 à 50 % est obtenu. Les plants microgreffés sont cultivés «in vitro» sur milieu MS (1962) modifié, enrichi en saccharose. Six semaines sur ce milieu de culture sont nécessaires pour l'obtention de plants transférables en sol. L'acclimatation des plants transférés en sol permet un taux de reprise de 70 %.

*oranger Washington Navel / porte greffe Citrange Troyer / microgreffage / méristèmes / in vitro*

**Abstract** - The study has concerned the micrografting of shoot tips of three orange tree clones on the rootstock Citrange Troyer in order to obtain virus-free plants. The micrografting of shoot tip used plantlets from 2 weeks old seed germinated in vitro in dark conditions. A 30% to 50% frequency of successful grafts was obtained. Grafted plants were cultivated in vitro on modified MURASHIGE and SKOOG (1962) medium, riched with sucrose. Six weeks on this medium were necessary before the transfert of the grafted plants to the soil. The plant acclimatization has permitted 70% survival.

*orange tree Washington Navel / rootstock Citrange Troyer / micrografting / meristems*

### INTRODUCTION

Les agrumes constituent l'espèce fruitière à pépins la plus importante d'Algérie par la superficie qu'elle occupe. Cette espèce se trouve confrontée à de nombreux problèmes tels que le vieillissement et les maladies à virus. Le microgreffage de méristèmes «in vitro» est la technique la plus utilisée pour

régénérer les variétés d'agrumes atteintes par les maladies de dégénérescence causées par des virus, des viroïdes, des mycoplasmes ou des bactéries endocellulaires (Murashige et al, 1972). La technique a été mise au point et optimisée par Navarro et al (1975). Elle a permis en 1978 en Corse l'assainissement de quatre vingt dix lignées d'agrumes virosées (Vogel et al, 1984).

Souvent le microgreffage est associé à la

thermothérapie pour l'assainissement de certaines maladies à virus souvent difficile à guérir (Roistacher, 1977; Nyland et al, 1969).

Dans ce présent travail, la technique de microgreffage d'apex utilisée est celle décrite par Navarro et al (1975). Trois clones de l'oranger Washington Navel (clones 39, 205 et 141) sont utilisés sur le porte greffe Citrange Troyer.

## MATERIEL ET METHODES

### *Matériel végétal*

De jeunes pousses de différents clones identifiés de l'oranger Washington Navel (*Citrus sinensis*) ont été prélevées à la station de l'ITAFV de Boufarik et stockées au réfrigérateur pour une période ne dépassant pas une semaine pour le prélèvement des méristèmes. Des fruits du porte greffe Citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* L. x *Citrus sinensis* L.osb) pour l'extraction des graines ont aussi été prélevés sur un arbre identifié à la station ITAFV de Boufarik.

### *Désinfection des graines*

Les graines sont extraites des fruits, lavées abondamment à l'eau courante, séchées ensuite pelées puis sont désinfectées avec une solution d'hypochlorite de sodium à une concentration de 0.7 % additionnée de 0.1% de Tween 20 pendant 10 minutes et rincées trois fois à l'eau distillée stérile.

### *Mise en culture des graines*

Les graines sont cultivées «in vitro» individuellement dans des tubes à essai contenant 25 ml de milieu MS (Murashige et Skoog, 1962), solidifié avec 10 g d'agar et autoclavé à 120°C pendant 20 mn. Ils sont ensuite placés dans une chambre de culture à une température de 27° C à l'obscurité totale pendant deux semaines (Navarro et al, 1975).

### *Préparation des bourgeons*

Les bourgeons sont prélevés sur des arbres en champ pendant la période de bourgeonnement. Les pousses mesurant 1cm de long sont stérilisées avec une solution épicytyle de sodium à 0.25 % additionnée de 0.1 % de Tween 20 et rincées trois fois à l'eau distillée stérile.

### *Microgreffage*

La méthode la plus utilisée pour le microgreffage est le T inversé (Navarro et al, 1975).

Il s'agit de couper la tige à 1.5 cm à partir de l'épicytyle et les racines à 4 cm du porte greffe germé «in vitro». Les cotylédons et les bourgeons axillaires sont enlevés.

L'incision se fait en coupant à partir du sommet 1mm vers le bas et 1 à 2 mm horizontalement de façon à former un T inversé. Sous une hotte à flux laminaire et sous une loupe binoculaire, le méristème avec deux feuilles primordia, l'ensemble mesurant 0.1 à 0.2 mm est prélevé à partir de l'apex des jeunes pousses, ensuite placé à l'intérieur de l'incision faite du porte greffe tout en ayant les deux surfaces coupées en contact (fig.1).

### *Milieu de culture*

Le milieu de culture pour le développement des plants microgreffés est un milieu liquide composé de sels minéraux de MS (Murashige et Skoog, 1962), 100 mg/l d'inositol, 0.2 mg/l de thiamine, 1 mg/l de pyridoxine, 1 mg/l d'acide nicotinique, et 75 g de saccharose (Navarro et al, 1975). Du papier filtre coupé en rondelles et perforé au centre sert de support aux plantes microgreffées. Le milieu est ensuite autoclavé à 120° C pendant 20 mn

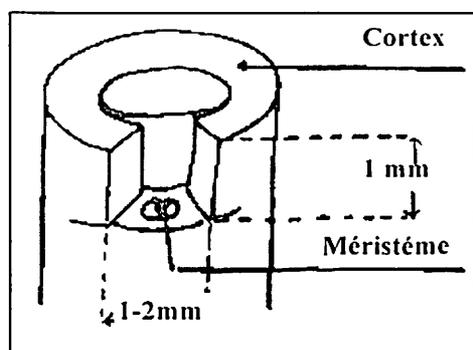


Fig 1. Schéma d'un microgreffage en T inversé

### Culture des plants microgreffés:

Les plants microgreffés sont mis en culture dans un milieu liquide et placés dans une chambre de culture à une température de 27° C et une photopériode de 16 heures de lumière.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Après trois semaines de culture, tous les méristèmes microgreffés n'évoluent pas, certains se développent et donnent de jeunes feuilles, les autres forment des cals qui se dessèchent par la suite. En plus, le pourcentage de reprise au microgreffage varie d'un clône à un autre. Le clône 205 donne le pourcentage le plus élevé (tableau I). Ces résultats sont très voisins de ceux cités par la bibliographie (Navarro, 1981, Navarro et al, 1980, Vogel et al, 1988).

Chaque plant issu du microgreffage de méristèmes est considéré comme une tête de lignée. Ainsi dans le tableau I, on note pour le clône 205 par exemple que nous disposons de quatre têtes de lignées. Lorsque les caractères pomologiques du plant microgreffé ainsi que l'état sanitaire sont vérifiés, une seule plante est conservée et isolée à l'abri des insectes vecteurs de maladies infectieuses (Vogel et al, 1988).

### Acclimatation

Après six semaines en chambre de culture, les plants sont transférés au sol dans des boîtes en plastiques contenant de la tourbe et du sable (à un rapport de 1:1). Les boîtes sont fermées et scellées à l'aide de la parafilm afin d'avoir des conditions d'atmosphère confinée. Après huit à dix jours, on ouvre graduellement les boîtes jusqu'à ouverture totale. 70 % des plants sont acclimatés.

## CONCLUSION

Cet essai nous a permis de régénérer des plants à partir de méristèmes greffés. Des résultats intéressants ont été obtenus. L'intérêt de la technique décrite par Navarro et al (1975), n'est pas d'obtenir un grand nombre de plants. En effet, un plant est suffisant à la reconstitution d'un verger lorsqu'il est conforme à la plante mère et indemne de virus.

Tableau I. Réponse des différents clônes du cultivar Washington Navel au microgreffage .

variété	W.N clône 39	W.N. clône 205	W.N clône141
<i>Porte greffe</i>			
Nombre de microgreffage effectué	10	8	6
Nombre de microgreffage repris	4	4	2
Pourcentage de réussite	40 %	50 %	33.3 %

## REFERENCES

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473-497
- Murashige T, Bitters WP, Rangan TS, Nauer EM, Roistracher CN, Holliday BP (1972) A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. *Hortscience* 7, 118-1119
- Navarro L, Roistacher CN, Murashige T (1975) Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free citrus. *J. Am Soc Hort. Sci* 100, 471-479
- Navarro L, Juarez J, Ballester JF, Pina JA (1980) Elimination of some citrus pathogens producing psorosis-like leaf symptoms, by shoot tip grafting in vitro. In Calavan EC, Garnsey SM, Tiner L. W Proc 8th Conf Int Organization Citrus Virol, IOC.V, pp 162-166
- Navarro L (1981) Citrus shoot tip grafting in vitro and its application. Proc Int Soc Citriculture 1, 452-456
- Nyland G, Goheen AC (1969) Heat therapy of virus diseases of perennial plants. *Ann Rev Phytopathol* 7, 331-354
- Roistacher CN (1977) Elimination of citrus pathogens in propagative bud wood. I. Budwood selection, indexing and thermotherapy. Proc Int Soc Citriculture 3: 965-972
- Vogel R, Nicoli M, Bove JM (1988) Le microgreffage de méristèmes in vitro. Son utilisation en Corse pour la régénération des agrumes. *Fruits* 43 (3), 167-173

## Contribution à l'étude de la réponse protéique de trois cultivars de blé dur (*Triticum durum* Desf.) au déficit hydrique.

M. F. Hamana-Koriehi

INRAA, Laboratoire de Physiologie Végétale, CRP Mehdi Boualem, BP 37, Baraki, 16210, Alger

**Résumé** - L'étude a consisté en la comparaison de la réponse protéique de trois cultivars de blé dur (Sham 1, Oued-zénati et Kabir) vis à vis du déficit hydrique. Elle n'a pas permis de mettre en évidence une synthèse de novo des protéines spécifiques au stress hydrique ou en relation avec leurs capacités à l'ajustement osmotique. Une activation et une répression de quelques gènes ont été notés.

*blé dur / protéines de stress / déficit hydrique*

**Abstract** - This study consisted in the comparison of the protein response of three durum wheat (Sham1, Oued-zenati, Kabir) toward drought. No de novo synthesis of drought specific proteins has been found, and no direct relation between their protein response and their capacity to osmotic adjustment shown. An activation and a repression of some genes have been noted on the basis of their transcription products.

*durum wheat / heat shock like proteins / drought*

### INTRODUCTION

Les plantes sont souvent sujettes à un grand nombre de stress environnementaux (sécheresse, salinité, hautes et basses températures ...) et ce durant les différents stades végétatifs.

Pour y faire face, les plantes ont au cours du temps développé de nombreuses stratégies d'adaptation, les divers mécanismes impliqués peuvent se situer à divers niveaux d'organisation (cellule, organe ou encore plante entière).

Il existe un grand nombre d'approches visant à décrire, quantifier et analyser les mécanismes conférant aux plantes une tolérance voire une résistance aux divers stress abiotiques. L'une d'elle consiste à identifier les changements quantitatifs et qualitatifs des polypeptides. En effet de nombreux travaux (Heikkila et al, 1984; Lin et al, 1984; Burke et al, 1985; Kimpel et Key, 1985; Ramagopal, 1987; Hurkman et al, 1988; Krishnan et al, 1989; Kimpel et al, 1990; Vierling et Nguyen, 1990) ont montré que les plantes supérieures synthétisaient en réponse à des stress thermiques, salins,

osmotiques et hydriques des groupes de polypeptides de poids moléculaires divers (26 à 90 KDa). Leur rôle n'est pas clairement établi, cependant en se basant sur leurs caractéristiques, ces protéines interviendraient activement dans la réponse au stress (Bohnert et al, 1995). Ainsi certaines pourraient intervenir dans le processus de dessiccation (Blackman et al, 1991) d'autres dans le maintien de l'intégrité cellulaire.

Il existerait une variabilité intraspécifique de ces protéines (Zivy, 1987).

Les objectifs de ce travail préliminaire sont de comparer la réponse protéique de trois cultivars de blé dur (Sham1, Oued-zénati et Kabir), choisis pour présenter des tolérances diverses au déficit hydrique et des capacités à l'ajustement osmotiques variables lorsqu'ils sont soumis à un déficit hydrique modéré, de voir si des protéines spécifiques au déficit hydrique étaient synthétisées et s'il existait des corrélations entre les capacités à l'ajustement osmotique et les réponses protéiques.

## MATERIEL ET METHODES

### *Matériel végétal*

L'expérimentation a concerné trois cultivars de blé dur (*Triticum durum* Desf.): Oued-zénati 368: variété assez précoce sélectionnée dans la population Bidi de la région de Constantine, elle présente une capacité moyenne à l'ajustement osmotique, Sham1 qui est une variété de l'ICARDA (International Centre for Agriculture Research in Dry Areas) précoce, à paille courte, tolérante à la sécheresse présentant une productivité supérieure à Oued-zénati 368 et un indice de récolte élevé (Ali Dib et Monneveux, 1992) ainsi qu'une assez grande plasticité et Kabir, variété productive créée par l'ICARDA présentant une assez grande sensibilité à la sécheresse (Ali Dib et al, 1992).

### *Condition de culture*

Les plantes ont été cultivées dans des pots de polyéthylène de 0.5 l contenant de la vermiculite, à raison d'une plante par pot. L'essai a comporté deux traitements: un lot témoin arrosé régulièrement de solution nutritive Hoagland-Arnon et un lot soumis à un stress hydrique (5 jours d'arrêt d'arrosage, 80% de la capacité au champ).

### *Extraction des protéines*

Des extraits de feuilles et de racines ont été broyés et homogénéisés dans la solution de Laemmli (1970), l'homogénat a été amené à 100° C pendant 3 minutes puis centrifugé (5 mn à 5000 g à 20°C).

### *Dosage des protéines*

Le dosage des protéines a été effectué à l'aide d'un kit de dosage sigma utilisant le principe de la réduction protéique alcaline du cuivre (CuII).

### *Support électrophorétique*

Le support électrophorétique est constitué de deux gels de polyacrylamide superposés : le gel de séparation (à 12 % d'acrylamide) et le gel de concentration, à 3% d'acrylamide qui permet de filtrer les extraits protéiques en arrêtant les constituants indésirables (amidon, membranes) plus ou moins liés aux protéines.

### *Poids moléculaire des protéines*

Pour évaluer le poids moléculaire des différentes bandes protéiques un kit sigma a été utilisé, il comprenait la phosphorylase b (97.4 KDa), l'albumine de sérum bovin (66.2 KDa), l'ovalbumine (45 KDa), l'anhydrase carbonique bovine (31 KDa), l'inhibiteur de la trypsine de soja (21.5KDa) et une lysozyme (14.4 KDa).

### Révélation des gels

La coloration des gels a été effectuée au bleu de coomassie.

## RESULTATS

Le dosage des protéines a permis de montrer l'existence de différences entre les plantes témoins et soumises au stress comme l'indique le tableau I.

Les feuilles et les racines des individus soumis au déficit hydrique présentent une concentration en protéines totale plus élevée que les individus témoins. Pour une quantité fixée de protéines totales, la figure 1 représentant le gel montre des différences qualitatives dans les profils protéiques foliaires. Ainsi certaines bandes (flèche a) semblent être plus importantes chez le stressé que chez le témoin, d'autres semblent suivre une tendance inverse (flèche b) c'est le cas en particulier du cultivar Kabir.

Une synthèse *de novo* de protéines spécifiques au stress hydrique n'a pas été observé. Les polypeptides concernés

présentent des poids moléculaires divers (faibles à élevé).

## DISCUSSION

Un taux de protéines totales plus élevé est observé chez les plantes stressées, cela peut s'expliquer par la perte en eau subite par les organes entraînant ainsi une concentration plus élevée de protéines par gramme de matière fraîche.

Il semble qu'il y ait une activation de la synthèse de certains polypeptides de poids moléculaires compris entre 34 et 95 KDa. Cela rejoint les résultats de Lin et al (1984), Kimpel et al (1985), Hurkman et Tanaka (1988) et Vierling et Nguyen (1990). Il est à noter que cela est particulièrement le cas de Kabir qui est aussi le cultivar présentant l'ajustement osmotique le plus faible.

Certaines bandes (90.5 KDa) semblent plus importantes chez les témoins, il pourrait alors s'agir d'une répression de certains gènes par la contrainte hydrique, ce type de réponse ayant été observé pour le stress salin chez l'orge par Hurkman et al (1988).

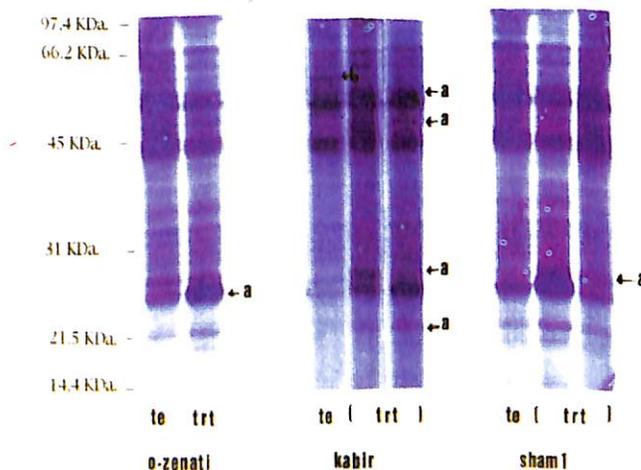


Fig 1. Réponse protéique des trois cultivars face au déficit hydrique O-Zenati = Oued-Zenati, Trt = Traitement, Te = Témoin

**Tableau I.** Teneur en protéines totales des feuilles et des racines de trois cultivars. Les teneurs sont exprimées en mg/ml d'extrait brut.

Cultivars	Feuilles		Racines	
	Traitement	Témoin	Traitement	Témoin
SHAM I	0.7984	0.7258	0.8856	0.8249
KABIR	0.7444	0.6984	0.7032	0.6869
OUED-ZENATI	0.7804	0.7293	0.7644	0.7555

## CONCLUSION

L'essai des protéines n'a pas permis une identification de polypeptides spécifiques au stress hydrique, les conditions sous serre n'ayant pas pu être entièrement contrôlées. Une relation directe n'a pas pu être mise en évidence entre la capacité à l'ajustement osmotique élevée et la réponse protéique. Cependant, une réponse quantitative a été notée.

Le modèle des HSPs (synthèse de protéines induites par une contrainte abiotique et conférant aux plantes une meilleure tolérance) reste cependant très prometteur et il pourrait être très intéressant de caractériser plus en avant les marqueurs biochimiques et moléculaires du stress hydrique.

La nature des produits subissant des modifications au cours du stress pourrait être précisée par des techniques de séparation plus fine telle que l'électrophorèse bidimensionnelle, et l'utilisation d'anticorps spécifiques.

## REFERENCES

- Blackman SA, Wettlaufer SH, Obendorfer L, et Léopold AC (1991) Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. *Plant Physiol* 96, 868-874
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995) Adaptations to environmental stresses. *The plant cell* 7, 1999-2011
- Burke JJ, Hatfield JL, Klein RR, Mullet JE (1985) Accumulation of heat shock proteins in field-grown cotton. *Plant physiol* 78, 394-398
- Heikkila JJ, Pap JET, Schultz GA, Derek Bewley J (1984) Induction of heat shock protein messenger by water stress, abscisic acid and wounding. *Plant Physiol* 90, 140-145
- Hurkman WJ, Tanaka CK (1988) Polypeptide change induced by salt stress, water deficit and osmotic stress in barley roots: A comparison using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 9, 781-787
- Hurkman WJ, Tanaka CK, Dupont FM (1988) The effect of salt stress on polypeptides in membrane fractions from barley roots. *Plant Physiol* 88, 1263-1273
- Kimpel JA, Key JL (1985) Presence of heat shock mRNAs in field grown soybeans. *Plant physiol* 79, 672-678
- Kimpel JA, Nagao RT, Goekjian V, Key JL (1990) Regulation of the heatshock response in soybean seedlings. *Plant Physiol* 94, 988-995
- Krishnan M, Nguyen HT, Burke JJ (1989) Heat shock protein synthesis and thermal tolerance in wheat. *Plant Physiol* 90, 140-145

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lin CY, Roberts JK, Key JL (1984) Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. Synthesis and accumulation of heat shock proteins and their cellular localization. *Plant Physiol* 74, 152-160
- Ramagopal S (1987) Salinity stress induced tissue specific proteins in barley seedlings. *Plant Physiol* 84, 324-331
- Zivy M (1987) Genetic variability for heat shock proteins in common wheat. *Theor Appl Genet* 74, 209-213