



## Mise au point d'un test *in vitro* de comportement au sel de quatre géotypes d'agrumes

Ouiam CHETTO<sup>2</sup>; Dominique DAMBIER<sup>3</sup>; Anas FADLI<sup>2</sup>; Rachid BENKIRANE<sup>2</sup>; Abdehak TALHA<sup>1</sup>; Hamid BENYAHIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> : Institut National de la Recherche Agronomique, INRA Maroc, CRRRA Kenitra, BP 257, Kenitra, Maroc

<sup>2</sup> : Université Ibn Tofaïl, Faculté des Sciences, Laboratoire de Botanique et de Protection des Plantes, B.P. 133, Kénitra, Maroc.

<sup>3</sup> : Cirad, Umr Agap TA A-108/02, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Auteurs correspondant, E-mail : [hamidbenyahia2002@yahoo.fr](mailto:hamidbenyahia2002@yahoo.fr)

Original submitted in on 18<sup>th</sup> February 2015. Published online at [www.m.elewa.org](http://www.m.elewa.org) on 30<sup>th</sup> April 2015  
<http://dx.doi.org/10.4314/jab.v88i1.1>

### RESUME

**Introduction :** La salinité des sols et des eaux d'irrigation constituent une contrainte abiotique dont les conséquences impactent autant la production que la qualité des agrumes. L'utilisation d'un porte-greffe résistant à ces conditions apparaît la solution la plus adaptée.

**Objectifs :** Cette étude vise à évaluer le comportement au sel de cellules indifférenciées de différents géotypes d'agrumes, cultivées parallèlement sur milieux liquide et solide.

**Méthodologie et résultat :** Des cals de quatre géotypes d'agrumes : *mandarinier Cléopâtre* (*Citrus reshni* hort ex Tan), *mandarinier commun* (*Citrus delicosa* Ten.), *pomelo Star Ruby* (*Citrus paradisi* Macfad.cv Star Ruby) et *orange Shamouti* (*Citrus sinensis*) ont été maintenus sur des milieux MT renfermant des doses de NaCl 0, 50, 100, 150 et 200 mM. Les résultats ont montré que les différents niveaux de stress de salinité ont eu un effet significatif sur la croissance des cellules. En outre, la salinité a augmenté de façon significative le niveau de chlorures des géotypes testés.

**Conclusions et application des résultats :** Un comportement différentiel sur les niveaux de tolérance à la salinité a été révélé, entre géotypes d'une part, et entre types de milieu d'autre part. Le mandarinier Cléopâtre et le pomelo Star Ruby ont montré la meilleure réponse sous stress salin. La culture des suspensions cellulaires peut être un outil efficace pour étudier le comportement des géotypes d'agrumes vis-à-vis la salinité.

**Mots clefs :** Agrumes, salinité, tolérance, cals, suspension cellulaire

### ABSTRACT

**Introduction:** Soil and water salinity is an important abiotic stress that can affect both production and quality of citrus fruits. The use of tolerant rootstocks under these conditions would be a promising solution.

**Objectives:** The aim of this study was to compare *in vitro* behavior of four citrus genotypes in terms of salt tolerance using callus and cells grown in parallel on liquid and solid media.

**Methodology and Results:** In this regard, calluses of four genotypes of citrus: Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* hort ex Tan), Willow leaf mandarin (*Citrus delicosa* Ten.), 'Star Ruby' grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.cv Star Ruby), 'Shamouti' sweet orange (*Citrus sinensis*) were maintained on MT media containing different NaCl doses, i.e: 0, 50, 100, 150 and 200 mM. The results showed that the different salt levels used had a significant

effect on cell growth, resulting in a decrease in fresh and dry weights. In addition, salinity increased considerably Chloride concentrations in the tested genotypes.

*Conclusions and application of findings:* A differential behavior of salt tolerance was found between citrus calluses used depending on genotype on one hand, and type of medium on other hand. Compared to the other genotypes, Cleopatra mandarin and Star Ruby grapefruit showed the best performance under salt stress conditions. These results suggest that culture cell suspensions can be an effective tool for studying the behavior of citrus species under salinity.

**Keywords:** Citrus, salinity, tolerance, callus, cell suspension

## INTRODUCTION

Le secteur des agrumes détient un poids économique et social important dans la configuration de l'agriculture et de l'économie marocaine. En effet, l'agrumiculture occupe une superficie de plus de 110000 ha (Anonyme, 2013), et produit en moyenne 2 millions de tonnes dont la majorité est exportée (Anonyme, 2010). Cependant, le rendement moyen national (soit 20 T/ha) reste faible en comparaison avec d'autres pays producteurs comme le Brésil, les États-Unis et la Chine (Anonyme, 2013). Cette situation de faible productivité dans laquelle se trouve le système agrumicole marocain est dû à de nombreux facteurs d'origines biotique et abiotique. La salinité connaît aujourd'hui dans les régions agrumicoles arides et semi-arides une progression inquiétante. En effet, une étude a été réalisée sur l'eau d'irrigation dans trois régions agrumicoles du Maroc (Benyahia, 1998). L'auteur a montré que les eaux d'irrigation des trois régions sont très salées pour la majorité des points de prélèvement. Par ailleurs, le taux se situe souvent entre 1,5 et 2 g/litre (Benyahia, 1998 ; 2007). Depuis les travaux de Bernstein (1969), plusieurs autres travaux ont été consacrés à l'effet de la salinité sur les agrumes (François et Maas, 1985; Shalhevet et Levy, 1990; Levy et Syvertsen, 2003; García-Sánchez *et al.*, 2006). Comparés à d'autres cultures, les agrumes sont parmi les espèces végétales les plus sensibles aux sels (Levy *et al.*, 1999 ; Story et Walker, 1999 ; Maas, 1993 ; Levy et Syvertsen, 2003) et les pertes de rendement peuvent aller jusqu'à 13% lorsque la conductivité électrique dépasse le seuil de tolérance de cette culture qui est égale à 1,4dS /m (Story et Walker, 1999). La maîtrise de l'incidence de ces contraintes abiotiques repose principalement sur l'utilisation d'un porte-greffe tolérant. Il est admis que la tolérance des agrumes à la salinité varie

énormément entre les espèces et dépend principalement du porte-greffe (Maas, 1993 ; Story et Walker, 1999 ; Pestana *et al.*, 2005 ; Navarro *et al.*, 2014). Le porte-greffe le plus utilisé au Maroc est le bigaradier (*Citrus aurantium* L.) en raison de son adaptation à la majorité des sols et de son effet sur la qualité de la production (Chapot et Cassin, 1961; Aubert et Vullin, 1997; Omari *et al.*, 2012). Malheureusement son utilisation est remise en cause depuis l'arrivée dans le Bassin méditerranéen du virus de la *Tristeza* et de sa sensibilité à ce virus. La plupart des pays producteurs sont ainsi engagés à la reconversion de leur verger par l'utilisation de porte-greffes de substitution. En outre, la résistance de ce porte-greffe aux attaques de *Phytophthora spp* se trouve également affectée en sol salin ou par l'eau d'irrigation (Sulistywati et Keane, 1992; Benyahia *et al.*, 2004 ; Benyahia, 2007). Il apparaît ainsi que la sélection de nouveaux porte-greffes présentant des tolérances aux contraintes biotiques (*Tristeza*, *Phytophthora*, nématodes) et abiotiques (calcaire, salinité stress hydrique), tout en conférant un niveau de qualité élevée aux oranges et petits agrumes, constitue un objectif majeur pour notre pays. Le *Poncirus trifoliata* et certains de ses hybrides avec les espèces du genre 'citrus' sont résistants à la *Tristeza*, très tolérants aux *Phytophthora spp.* et confèrent généralement une bonne qualité aux oranges et mandarines. Ils sont en revanche très mal adaptés aux sols salins ou calcaires. Le *Poncirus* est par ailleurs très sensible à l'*Exocortis* (viroïde transmissible par greffe et par les outils de taille). Différents porte-greffes sont connus pour leur tolérance à la chlorose ferrique liée aux sols calcaires (*C. depressa*, *C. jambhiri*, *C. limonia*.) ou à la salinité (*C. limonia*, *C. reshni*, *C. macrophylla*, *C. amblycarpa*), mais présentent des sensibilités à

d'autres contraintes biotiques (*Tristeza*, *Phytophthora*). La sélection de porte-greffes résistants à la salinité est souvent réalisée à l'échelle de la plante (Sykes, 2011; Hussain *et al.*, 2012 ; Simpson *et al.*, 2014). La plupart des résultats contradictoires sont dus aux conditions expérimentales et notamment les variations climatiques. Au cours des dernières années, des cultures cellulaires ont constitué des outils précieux pour tenter d'élucider les mécanismes de tolérance au sel (Sabbah et Moshe, 1990; Davenport *et al.*, 2003; Venkataiah *et al.*, 2004; Al-Rawahy *et al.*, 2012). À cet égard, de nombreux chercheurs ont suggéré que les tissus et les cellules en culture peuvent être utiles à la fois dans la sélection des plantes tolérantes au sel et à la fois dans l'étude de la base physiologique de la tolérance à la salinité (Chen *et al.*, 1980; Umiel *et al.*, 1980). Les techniques de culture *in vitro* permettent un contrôle, des environnements uniformes pour étudier la réponse stress salin de cal indifférenciée, éliminant

ainsi les complications dues aux variabilités morphologique et génétique associées à des tissus de plantes entières, même au sein de la même espèce (Stavarek et Rains, 1984). Les mécanismes de tolérance au sel impliqués au niveau de la plante entière pourraient toutefois être très différents de ceux impliqués au niveau de cellules isolées (Adams *et al.*, 1992). En effet, les cellules en culture sont des systèmes simples et importants qui offrent une approche directe des changements dans le métabolisme cellulaire, et dans la cinétique de croissance qui peuvent indiquer des mécanismes d'adaptation liés à la tolérance au sel (Ben-Haim et Kochba, 1983; Piqueras *et al.*, 1994; Uno *et al.*, 1996 ; Bhat, *et al.*, 2013). Cette étude vise à mettre au point en conditions contrôlées, un test d'évaluation de tolérance à la salinité de différents géotypes d'agrumes à l'échelle de cellules indifférenciées cultivées en milieu liquide et en milieu solide sous forme de cal.

## MATERIEL ET METHODE

**Le matériel végétal :** Des jeunes fruits ont été cueillis cinq semaines après anthèse (Ollitrault *et al.*, 1992), auprès d'arbres matures de mandarinier Cléopâtre (*Citrus reshni*), mandarinier Commun (*Citrus deliciosa*), pomelo Star Ruby (*Citrus paradisi* cv Star Ruby) et orange Shamouti (*Citrus sinensis* cv Shamouti).

**Induction des cals :** Des petits fruits de quatre cultivars d'espèces du genre citrus mentionnés ci-dessus ont été désinfectés par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10 % (p/v) durant 15 minutes puis rincées 3 fois avec de l'eau distillée stérile. Les ovules ont été extraits et mis en culture dans un milieu MT (Murashige et Tucker, 1969), contenant 1mg.l<sup>-1</sup> kinétine, 0,5 g/l d'extrait de malt (ME), 50 g/l de saccharose et de 2 g/l de gelrite, pH 5,7. Les boîtes ont été scellées avec du film étirable puis placées à l'obscurité dans une enceinte thermo-régulée à 26 ± 2°C. Les cals obtenues ont été transférés au bout de 6 à 10 semaines sur le même milieu. Plusieurs subcultures ont été réalisées sur le milieu MT dépourvu d'hormone après stabilisation des cals.

### Application du stress salin

**Application du stress salin sur des cultures cellulaires en milieu solide (cals) :** Des cals friables de masse initiale de 0,5 g sont transférés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de base MT (Murashige et

Tucker, 1969) complété avec extrait de malt 0,5 g.l<sup>-1</sup>, le saccharose 50 g.l<sup>-1</sup>, la gelrite 2 g.l<sup>-1</sup> et pH 5,7. Le chlorure de sodium a été ajouté au milieu, à des concentrations de 0, 50, 100, 150 et 200 mM. Les boîtes de Pétri ont été scellées puis placées à l'obscurité dans une enceinte thermo-régulée à 26 ± 2°C pendant 5 semaines.

**Application du stress salin sur des cellules cultivées en milieu liquide :** Des suspensions cellulaires ont été initiées par transfert de cal friable de quatre géotypes dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu MT (Murashige et Tucker, 1969), 50 g.l<sup>-1</sup> de saccharose, 0,5 g.l<sup>-1</sup> d'extrait de malt et pH 5,7. Le milieu contenant le sel était identique à celui du témoin mais sans ajout de NaCl. Les erlenmeyers sont ensuite placés sur un agitateur (115 rpm) dans une chambre de culture à la lumière et de température régulée à 25 ± 1°C. Après une première phase de 20 jours d'initiation des cultures en milieu liquide, 0,5 g de cellules sédimentées a été transféré dans plusieurs erlenmeyers contenant 50 ml de milieu MT additionné des concentrations croissantes de NaCl et mise en incubation dans les mêmes conditions.

**Les paramètres mesurés :** La culture des cals et des suspensions cellulaires ont été stoppées au bout de cinq semaines. Les cellules ont été récupérées puis lavées avec une solution de MgSO<sub>4</sub> 0,5 mM afin d'éliminer les traces de NaCl (Tal *et al.*, 1978). Chaque expérience a

été renouvelée 3 fois. La matière fraîche a été déterminée sur des cellules recueillies sur papier Whatman. La matière sèche a été déterminée après séchage des cellules pendant 48 heures à 80°C. Le dosage des ions chlorures a été effectué au moyen d'une électrode à ion spécifique 'Thermo Orion' et la concentration en ions chlorures établie par une mesure de différence de potentiel reportée sur une courbe

d'étalonnage comportant différentes molarités de NaCl (Iglesias *et al.*, 2004).

**Analyse des résultats :** Les résultats obtenus ont été traités par analyse de la variance grâce au logiciel statistique SAS (SAS Institute Inc., NC, USA. version 9) et les moyennes significativement différentes ont été séparées par le test de Duncan au seuil de probabilité de 5%.

## RESULTATS

**Effet de la salinité (NaCl) sur la production de la biomasse fraîche des cellules en milieu liquide :** En milieu liquide, la croissance des cellules en suspension de quatre géotypes, exprimée en matière fraîche, décroît nettement lorsque la concentration en sel augmente dans le milieu. L'analyse de la variance pour la variable 'matière fraîche' a révélé une différence significative entre les traitements, les géotypes et l'interaction entre 'traitement x géotypes'. Le classement des moyennes montre que la différence entre les géotypes est bien marquée sous les différentes doses de NaCl. La biomasse fraîche de 'mandarinier commun' diminue avec augmentation de la concentration de NaCl (tableau 1). La réduction de la biomasse observée aux

traitements à 50 mM et 100 mM de NaCl était limitée respectivement à 8% et 23% par rapport au témoin non traité, alors qu'à 150 et 200 mM de NaCl, la réduction s'élevait à 56% et 79%. En revanche, la croissance des cals du 'mandarinier Cléopâtre' a été moins affectée par l'effet du NaCl : des niveaux presque similaires de biomasse ont été observés dans les traitements à 50, 100 ou 150 mM. En présence de niveau élevé de sel (200 mM), la matière fraîche a été réduite de 31% par rapport au témoin. Les mêmes valeurs de réduction de biomasse fraîche pour toutes les concentrations de NaCl ont également été observées pour les 2 géotypes 'pomelo Star Ruby' et 'orange Shamouti'.

**Tableau 1 :** Analyse de la variance pour la variable 'biomasse fraîche en milieu liquide'.

Source de variation	DL	CM	F	Pr > F
NaCl	4	4.90508703	70.31	<.0001
Géotypes	3	7.55269339	108.26	<.0001
NaCl*Géotypes	12	0.67415710	9.66	<.0001

**Tableau 2 :** Effets du NaCl sur la biomasse fraîche des cellules de quatre géotypes d'agrumes cultivés pendant 5 semaines en milieu liquide.

	Biomasse fraîche des cellules (g) en milieu liquide				
	0	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Oranger Shamouti	2.15 ± 0,55 <sup>b</sup>	1.31 ± 0,43 <sup>c</sup>	1.24 ± 0,37 <sup>b</sup>	1.02 ± 0,15 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.02 <sup>c</sup>
Mandarinier Cléopâtre	0.59 ± 0,01 <sup>c</sup>	0.48 ± 0,007 <sup>d</sup>	0.46 ± 0,004 <sup>c</sup>	0.48 ± 0,04 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.01 <sup>d</sup>
Mandarinier Commun	3.05 ± 0,21 <sup>a</sup>	2.79 ± 0,24 <sup>a</sup>	2.35 ± 0,18 <sup>a</sup>	1.33 ± 0,13 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.04 <sup>b</sup>
Pomelo Star Ruby	3.38 ± 0,04 <sup>a</sup>	2.02 ± 0,52 <sup>b</sup>	1.94 ± 0,53 <sup>ab</sup>	1.28 ± 0,08 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.1 <sup>a</sup>

Pour une même ligne, les géotypes suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Test de Duncan).

**Effet de la salinité (NaCl) sur la production de la biomasse sèche des cellules en milieu liquide :** La salinité a entraîné une diminution de la biomasse sèche des cellules cultivées en milieu liquide pour l'ensemble des géotypes testés (tableau 2). L'analyse statistique de la variance pour la variable 'biomasse sèche en milieu

solide' montre un effet hautement significatif des différentes concentrations de NaCl des géotypes et de l'interaction entre 'traitement x géotypes'. Ainsi, la comparaison des moyennes montre que la différence entre les géotypes est bien marquée aux différentes doses de NaCl sauf à '200 mM' où la différence n'est pas

significative. En effet, La réduction de la biomasse sèche à 150 mM et 200 mM de NaCl était respectivement de 82% et 84%, par rapport au traitement sans NaCl chez l'orange Shamouti et le mandarinier Commun. La

croissance des suspensions de la mandarine Cléopâtre apparait moins affectée par la salinité. À la plus forte concentration de NaCl, la biomasse sèche du pomelo Star Ruby était la plus élevée.

**Tableau 3.** Analyse de la variance pour la variable 'biomasse sèche en milieu liquide'

Source de variation	DL	CM	F	Pr > F
NaCl	4	0.18386061	48.35	<.0001
Géotypes	3	0.20829107	54.78	<.0001
NaCl*Géotypes	12	0.03198970	8.41	<.0001

**Tableau 4 :** Effets du NaCl sur la biomasse sèche des cellules de quatre géotypes d'agrumes cultivés pendant 5 semaines dans un milieu liquide

	Biomasse sèche des cellules (g) en milieu liquide				
	0	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Oranger Shamouti	0,55 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,075 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,002 <sup>a</sup>
Mandarinier Cléopâtre	0,08 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,014 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,073 ± 0,012 <sup>b</sup>	0,065 ± 0,009 <sup>a</sup>
Mandarinier Commun	0,42 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,070 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,067 ± 0,02 <sup>a</sup>
Pomelo Star Ruby	0,51 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,190 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,061 ± 0,01 <sup>a</sup>

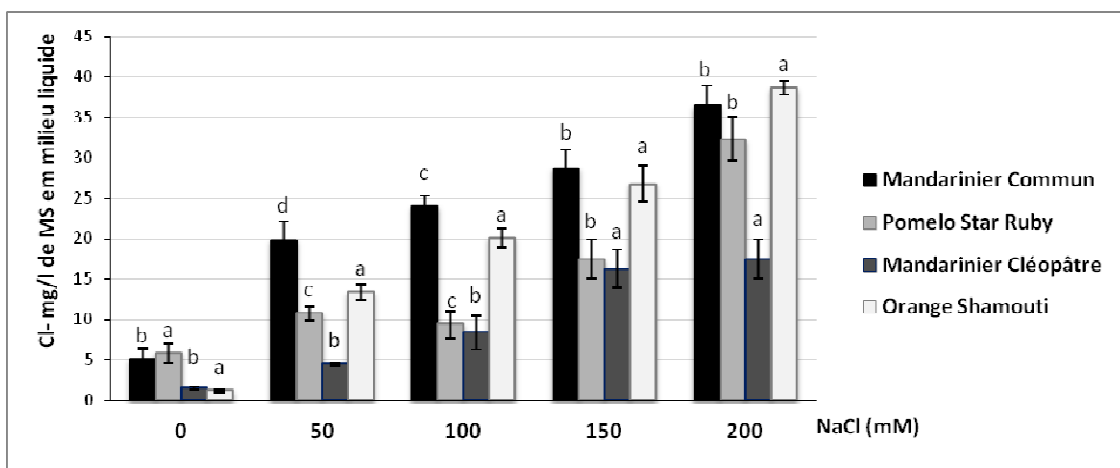
Pour une même ligne, les géotypes suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Test de Duncan).

**Effet de la salinité (NaCl) sur l'accumulation d'ion Cl<sup>-</sup> dans des cellules en milieu liquide :** L'analyse statistique de la variance pour la variable 'teneur en chlorures' en milieu liquide a montré qu'il y a une différence hautement significative entre les traitements, les géotypes et l'interaction 'traitement x géotype'. Le classement des moyennes d'accumulation en Cl<sup>-</sup> au niveau des cellules en suspension des quatre géotypes montre que la différence entre les géotypes est bien

marquée pour les différentes doses de sel. En effet, l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu conduit à une accumulation accrue de Cl<sup>-</sup> dans les cellules de l'ensemble des quatre géotypes testés (Fig. 1). La teneur la plus élevée a été enregistrée pour l'orange Shamouti ainsi que pour le pomelo Star Ruby et le mandarinier commun et la teneur plus faible pour la mandarine Cléopâtre.

**Tableau 5 :** Analyse de la variance pour la variable 'teneur en Cl<sup>-</sup> en milieu liquide'

Source de variation	DI	CM	F	Pr > F
NaCl	4	1316.458158	93,28	<.0001
Géotypes	3	503.533622	35,68	<.0001
NaCl*Géotypes	12	52.400603	3,71	0.0009



**Figure 1 :** Accumulation de chlorure dans les cellules cultivées en milieu liquide de quatre géotypes à différentes concentrations de NaCl. Pour chaque concentration de NaCl, les géotypes suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Test de Duncan).

**Effet de la salinité sur la production de la biomasse fraîche de cals cultivées en milieu solide :** Les mesures de masse fraîche des cals des quatre géotypes cultivés dans 0 à 200 mM de NaCl sont présentées dans le tableau 3. L'analyse statistique de la variance pour la variable 'matière fraîche en milieu solide' a révélé une différence hautement significative entre les traitements, les géotypes et les interactions 'traitements x géotypes'. La salinité du milieu de culture a réduit le taux de croissance de la majorité des cals

comparativement aux témoins. Le classement des moyennes montre que la différence entre les géotypes est bien marquée sous les différentes doses de NaCl. La croissance du mandarinier Cléopâtre ne semble pas affectée par l'augmentation de la concentration en sel dans le milieu de culture, exceptée à 200 mM où elle atteint un taux de 76% par rapport à celle du témoin. En revanche, les pourcentages de réduction étaient identiques pour les trois autres géotypes.

**Tableau 6 :** Analyse de la variance pour la variable 'biomasse fraîche en milieu solide'

Source de variance	DL	CM	F	Pr > F
NaCl	4	2.71686923	115.80	<.0001
Géotypes	3	1.15297975	49.14	<.0001
NaCl*Géotypes	12	0.30498478	13.00	<.0001

**Tableau 7 :** Effets du NaCl sur la biomasse fraîche des cals de quatre géotypes d'agrumes cultivés pendant 5 semaines sur milieu solide.

	Biomasse fraîche des cals (g) en milieu solide				
	0	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Oranger Shamouti	2,14 ± 0,59 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,546 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,99 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,06 <sup>b</sup>
Mandarinier Cléopâtre	0,59 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,524 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,509 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,50 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,46 ± 0,05 <sup>a</sup>
Mandarinier Commun	1,97 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,156 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,03 <sup>cb</sup>	0,50 ± 0,06 <sup>a</sup>
Pomelo Star Ruby	2,20 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,005 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,06 <sup>ba</sup>	0,67 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,52 ± 0,04 <sup>a</sup>

Pour la même ligne, les géotypes suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Test de Duncan).

**L'effet de la salinité (NaCl) sur la production de la biomasse sèche des cals en milieu solide :** Après 5

semaines de culture, les résultats obtenus montrent que la salinité a influencé la production de la biomasse sèche

*in vitro* des cals cultivés sur milieu solide. L'analyse de la variance a montré qu'il existe pour ce paramètre, une différence significative entre les traitements, les géotypes et l'interaction entre 'traitement x géotypes'. La comparaison des moyennes nous a permis de conclure que les porte-greffes diffèrent significativement au seuil de 5 % sous les différents traitements de NaCl.

Le tableau 4 montre que la salinité affecte le poids sec des cals des différents géotypes mais à un degré variable. En outre, les réductions les plus faibles de la biomasse sèche sont enregistrées chez mandarinier Cléopâtre et aucune distinction nette n'est décelée entre les autres géotypes pour les concentrations supérieures à 100 mM.

**Tableau 8 :** Analyse de la variance pour la variable 'biomasse sèche en milieu solide'

Source de variance	DL	CM	F	Pr > F
NaCl	4	0.20936450	159.64	<.0001
Géotypes	3	0.06585680	50.22	<.0001
NaCl*Géotypes	12	0.02301016	17.54	<.0001

**Tableau 9 :** Effets de NaCl sur la biomasse sèche des cals de quatre géotypes d'agrumes cultivés pendant 5 semaines dans un milieu solide

	Biomasse sèche des cals (g) en milieu solide				
	0	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
Oranger Shamouti	0.52 ± 0,02 <sup>a</sup>	0.350 ± 0,08 <sup>a</sup>	0.066 ± 0,013 <sup>b</sup>	0.21 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,006 <sup>b</sup>
Mandarinier Cléopâtre	0.11 ± 0,01 <sup>c</sup>	0.12 ± 0,003 <sup>b</sup>	0.066 ± 0,04 <sup>b</sup>	0.08 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,083 ± 0,02 <sup>a</sup>
Mandarinier Commun	0.4 ± 0,009 <sup>b</sup>	0.18 ± 0,016 <sup>b</sup>	0.141 ± 0,006 <sup>a</sup>	0.11 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,082 ± 0,005 <sup>a</sup>
Pomelo Star Ruby	0.51 ± 0,07 <sup>a</sup>	0.32 ± 0,02 <sup>a</sup>	0.09 ± 0,011 <sup>ba</sup>	0.12 ± 0,004 <sup>ba</sup>	0,072 ± 0,006 <sup>a</sup>

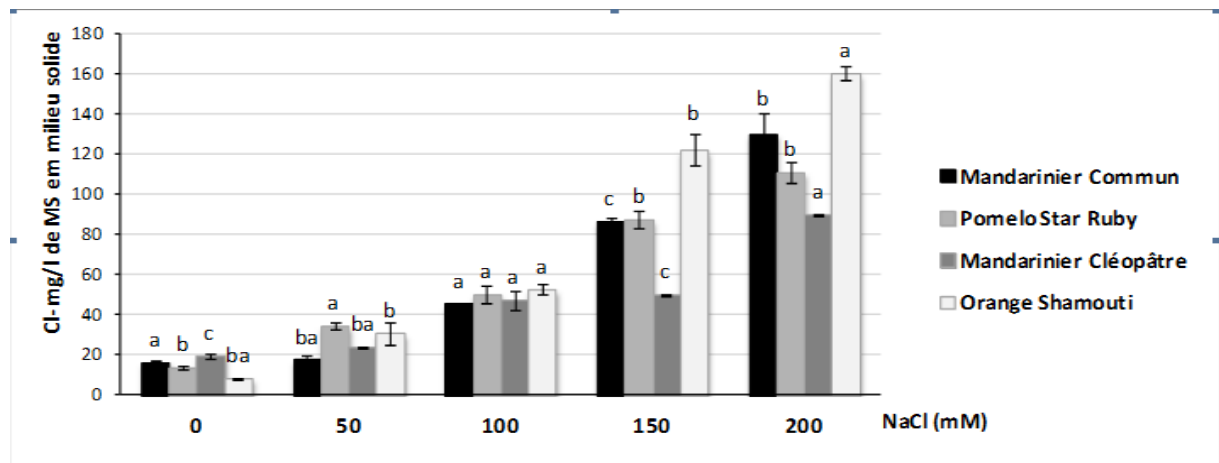
Pour une même ligne, les géotypes suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Test de Duncan).

**Effet de la salinité (NaCl) sur l'accumulation d'ion Cl<sup>-</sup> dans des cals cultivés en milieu solide :** La présence de NaCl dans le milieu de culture a induit une augmentation de la teneur en Cl<sup>-</sup> chez les cals de quatre géotypes. L'analyse statistique de la variance pour le variable 'teneur en chlorures' en milieu solide montre un effet très significatif des différentes concentrations de NaCl, des géotypes et de l'interaction entre les traitements et les géotypes. La comparaison des moyennes a permis fait apparaître que les quatre

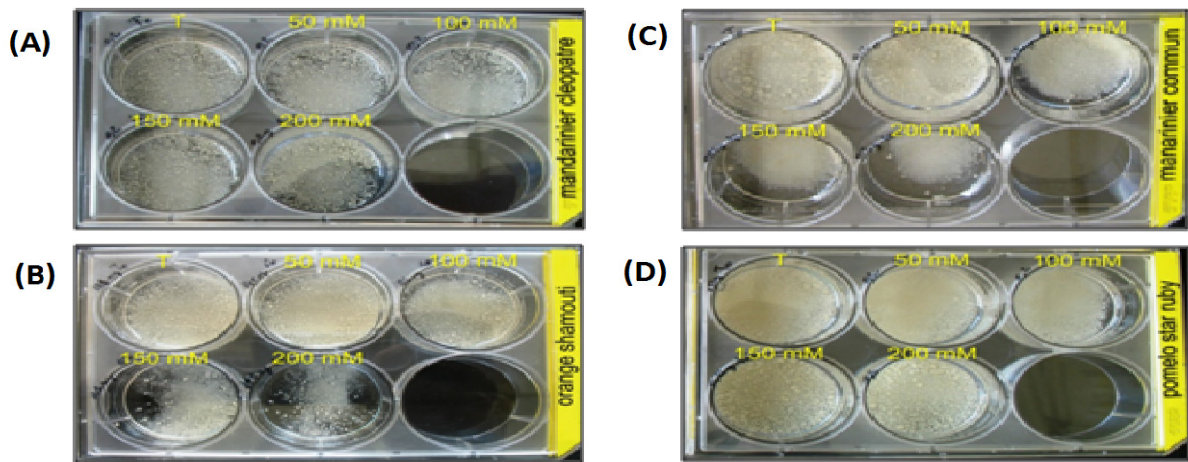
géotypes diffèrent significativement au seuil de 5% pour les cinq doses de NaCl. À des concentrations de NaCl supérieure à 100 mM, un comportement similaire a été montré chez les cellules de 'mandarinier Commun' et 'pomelo Star Ruby' (Fig. 2). Cependant, pour les plus fortes concentrations, une plus faible accumulation intracellulaire de Cl<sup>-</sup> était observée dans les cals de mandarinier Cléopâtre, alors que la teneur intracellulaire la plus forte était observée dans le contenu des cals d'oranger Shamouti.

**Tableau 10 :** Analyse de la variance pour la variable 'teneur de Cl<sup>-</sup> en milieu solide'

Source de variation	DI	CM	F	Pr > F
NaCl	4	2648.57186	216.89	<.0001
Géotypes	3	227.87252	18,66	<.0001
NaCl*Géotypes	12	96.78199	7,93	<.0001

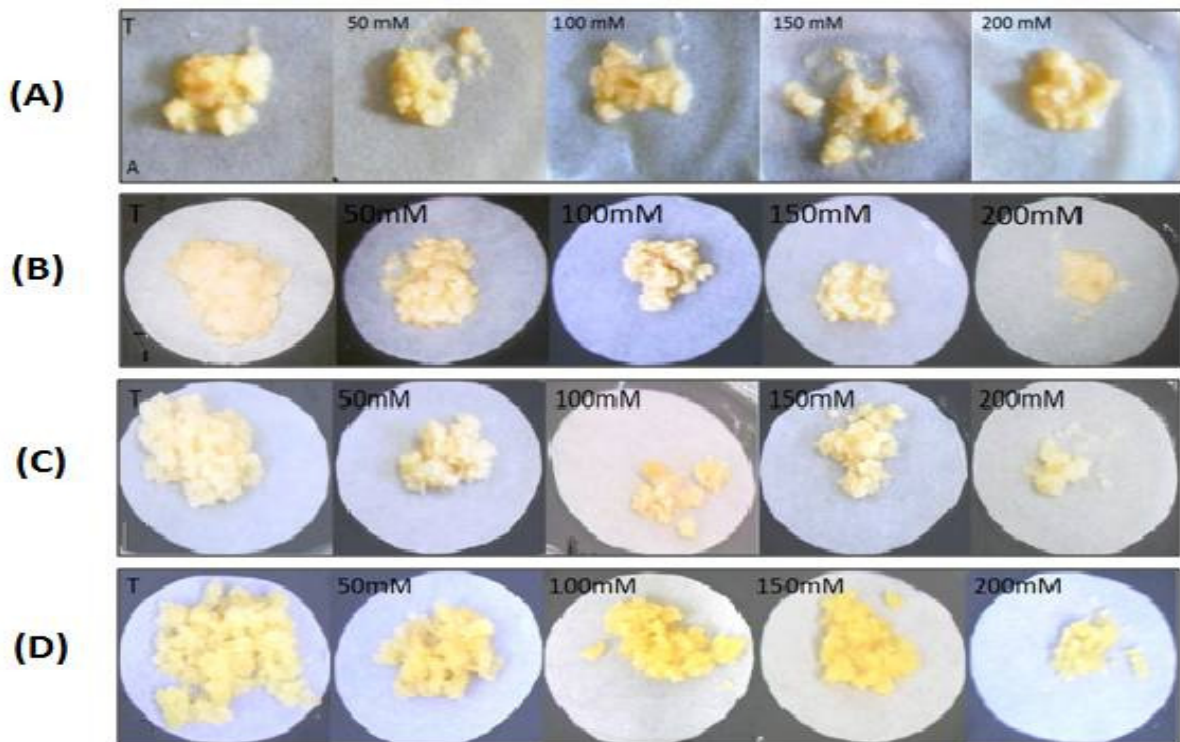


**Figure 2 :** Accumulation de chlorure dans les cellules cultivées en milieu solide de quatre géotypes à différentes concentrations de NaCl. Pour chaque concentration de NaCl, les géotypes suivis de la même lettre ne diffèrent pas significativement au seuil de 5% (Test de Duncan).



**Figure 3 :** Croissance des cellules cultivées en milieu liquide en présence de différentes concentrations de NaCl pour chacun des 4 géotypes (mandarinier Cléopâtre, mandarinier Commun, oranger Shamouti et pomelo Star Ruby)





**Figure 4 :** Croissance des cals des 4 géotypes en milieu solide à différentes concentrations de NaCl (A: mandarinier Cléopâtre, B : mandarinier Commun, C : orange Shamouti et D : pomelo Star Ruby)

## DISCUSSION

Les principaux résultats obtenus lors de cette étude, indiquent que les valeurs de biomasses fraîche et sèche des cellules cultivées en milieu solide et en milieu liquide préalablement soumises au stress salin, ont été inférieures à celles des témoins. Ces valeurs observées sont toutefois, d'autant plus faibles que la teneur en sel dans le milieu de culture est élevée. Des résultats similaires ont indiqué que la réduction de la croissance est un phénomène courant dans les cellules cultivées en milieu salin (Greenway et Munns, 1980; Rus *et al.*, 1999; Shankdhar *et al.*, 2000; Luts *et al.*, 2004; Venkataiah *et al.*, 2004) et constitue l'un des indices les plus importants de tolérance au stress salin (Noreen *et al.*, 2009). Cependant, le retard de croissance de la culture peut être dû au fait qu'une certaine quantité de l'énergie totale disponible pour le métabolisme des tissus, est utilisée pour résister à la pression (Cushman *et al.*, 1990). En milieu solide et en présence de sel, une réduction importante de biomasse par rapport à celle du témoin était observée, principalement pour l'orange Shamouti, le pomelo Star Ruby et le mandarinier commun. Cet effet restait imperceptible pour le mandarinier Cléopâtre à des concentrations inférieures à 150 mM de NaCl et une inhibition quasi-totale de la croissance des cals à 200 mM

NaCl était relevée chez tous les géotypes testés. Ces observations sont en accord avec des résultats concernant le comportement des cals d'orange Shamouti en présence de NaCl (Ben Hayyim et Kochba, 1983 ; Spiegel-Roy *et al.*, 1985). La faible réduction de biomasse du mandarinier Cléopâtre, est en accord avec le résultat de plusieurs auteurs (Moya *et al.*, 2003; Levy and Syvertsen, 2003). En milieu liquide, l'analyse des données a fait apparaître, sur tous les paramètres de croissance étudiés (biomasses fraîche et sèche), un effet inhibiteur du NaCl, toutefois moins marqué que sur cals en milieu solide. La production de la biomasse était très importante chez tous les géotypes, exceptée pour le mandarinier Cléopâtre. Cela pourrait être dû à sa faible vigueur (Moya *et al.*, 2002). La croissance cellulaire du pomelo Star Ruby était peu affectée pour les différents traitements y compris à 200 mM NaCl. Des résultats opposés ont été obtenus au stade 'plante' par Hussain *et al.*, 2012, pour le même géotype. L'inhibition de la croissance est communément observée; elle pourrait être due à l'excès de sel qui interfère avec plusieurs processus physiologiques et biochimiques, causant ainsi une diminution du potentiel de l'eau du milieu (Greenway et Munns, 1980), des perturbations de l'alimentation

minérale et des concentrations des régulateurs de croissance (Termaat *et al.*, 1985; Kuiper *et al.*, 1990; Allakhverdiev *et al.*, 2000). Par ailleurs, d'autres conséquences physiologiques dues à la présence du sel peuvent contribuer à l'inhibition de croissance, comme une perturbation de l'activité de certaines enzymes ou encore l'induction d'un stress oxydatif (Turkan et Demiral, 2009) pouvant conduire à la mort cellulaire. Ces conditions peuvent interagir avec plusieurs composants cellulaires, y compris l'ADN, les protéines, les lipides et les pigments (Zhu, 2002), empêchant la croissance et le développement d'une grande majorité des cellules. Ces réductions de croissance s'accompagnent d'accumulation d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  plus ou moins importante dans les cellules. L'analyse minérale a montré que les géotypes testés accumulent des quantités différentes de  $\text{Cl}^-$  lorsqu'ils sont exposés à des concentrations élevées de  $\text{NaCl}$  (Fig. 1 et 2) quel que soit le type de milieu. Le contenu de  $\text{Cl}^-$  a augmenté de manière importante dans les cals d'orange Shamouti. Selon Ben Hayyim et Kochba (1983), le  $\text{Cl}^-$  avait un effet toxique sur les cals tolérantes de *Citrus sinensis*. En revanche, si la teneur en chlorures demeure légèrement plus importante dans les cellules de Mandarinier Commun, leur croissance ne semble pas être trop affectée. Sur la base des études faites par (Hussain *et al.*, 2012), le pomelo Star Ruby serait considéré comme un géotype tolérant au stress salin. Cependant, cette accumulation était plus faible dans les cals de mandarinier Cléopâtre. Les cellules sélectionnées

ont mis au point un mécanisme d'exclusion partielle des ions  $\text{Cl}^-$ . En effet, quelques porte-greffes d'agrumes tolèrent l'effet du stress salin en combinant une exclusion sélective de  $\text{Cl}^-$ . Plusieurs études ont décrit la mandarine Cléopâtre comme un bon exclureur de cet ion et de ce fait considéré comme l'un des porte-greffes d'agrumes tolérants au sel (Cooper *et al.*, 1952; Zekri et Parsons, 1992). Des tendances similaires ont été observées dans des suspensions cellulaires de *Medicago sativa* (Shah *et al.*, 1990; Chaudhary *et al.*, 1994), et la culture de cals de blue berry (Muralitharan *et al.*, 1992). Cette tendance suggère que les lignées de cellules sélectionnées pour leur tolérance au  $\text{NaCl}$ , ont développé des mécanismes d'exclusion d'ions  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  ou d'évitement pour combattre le stress salin. Il est important de souligner que la capacité d'accumuler des ions  $\text{Cl}^-$  est bien marquée lorsque les cellules sont cultivées sur un milieu solide. Fallon et Phillips ont considéré la culture de cellules en suspension comme un système modèle d'étude des réponses cellulaires aux divers stress abiotiques, y compris des différences entre la réponse à court terme et l'adaptation à long terme impliquant des changements physiologiques et biochimiques (Fallon et Phillips, 1989; Leone *et al.*, 1994). Des expériences préliminaires sur des cellules en suspension d'orange amère (*Citrus aurantium*) indiquent une meilleure performance à l'aptitude à la sélection des cellules tolérantes au sel (Koc *et al.*, 2009).

## CONCLUSION

L'effet de la salinité sur la croissance de cellules indifférenciées varie en fonction du géotype, de la concentration de  $\text{NaCl}$  et de la nature du milieu de culture. Dans toutes les expériences, seul le mandarinier Cléopâtre accumulait le moins de  $\text{Cl}^-$ , dans les cellules cultivées, alors que l'orange Shamouti apparaissait au contraire comme le géotype le plus sensible. Les

résultats concernant ces expérimentations sur cals ou suspensions cellulaires sont en accord avec ceux obtenus sur plante entière. Ils tendent à accréditer la fiabilité de ce test. Ainsi, nous avons démontré que la culture de cellules de plusieurs géotypes d'agrumes peut constituer un modèle d'étude efficace de comportement sous stress salin.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams P, Thomas JC, Vernon DM, Bohnert HJ, Jensen RG, 1992. Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol.* 33: 1215–1223.
- Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N, 2000. Ionic and osmotic effects of  $\text{NaCl}$ - induced inactivation of photosystems I and II *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.*, 123, pp1047-1056.
- Al-Rawahy SH and Farooq SF, 2011. Influence of Intracellular  $\text{Na}^+$ , K and  $\text{Cl}^-$  on the Salt Tolerance in Suspension Cell Cultures of *Medicago* media. *African Journal of Biotechnology.* (In-Press, Ref. 1684-5315).
- Anonyme, 2010. Bilan de la campagne 2010 /2011. Division de l'horticulture. Direction de la Production Végétale. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche maritime.

- Anonyme, 2013. Bilan Annuaire statistique. Direction de la Production Végétale. Ministère de l'agriculture.
- Aubert B et Vullin G, 1997. Pépinières et plantations d'agrumes. Editions Quae, 1 janv. 1997 - 184 p.
- Ben-Hayyim G et Kochba J, 1983. Aspects of Salt Tolerance in a NaCl-Selected Stable Cell Line of *Citrus sinensis*. *Plant Physiol* 72:685-690.
- Benyahia H, 1998. Effet de la salinité sur le développement des maladies à *Phytophthora* des agrumes au Maroc. Thèse de troisième cycle, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, 170pp.
- Benyahia H, 2007. Amélioration de la résistance des porte-greffes d'agrumes vis-à-vis des contraintes biotiques et abiotiques. Thèse de doctorat. Univ. Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fes, Maroc, 98 p.
- Benyahia H., Jrfi A., Ait Haddou M.M. and Lamsettef Y. (2004). Effect of salinity on resistance of citrus rootstocks to roots colonization by *Phytophthora parasitica*. *Fruit*, vol : 59, p 1-8.
- Bernstein L, 1969. Salinity factors and their limits for citrus culture. *Proc. 1st Int. Citrus Symp.* 3, 1779-1782.
- Chapot H et Cassin J. 1961. Maladies et troubles divers affectant les citrus au Maroc. *Al Awamia* I, pp. 107 à 142, octobre 1961.
- Chaudhary MT, Wainwright SJ, Merrett MJ, Shah M, 1994. Salt tolerant of Lucerne (*Medicago media* Pers.) regenerated from salt-selected suspension cultures. *Plant Sci.* 98: 97-102.
- Chen Y, Zahavi E, Berek P, Umiel N, 1980. Effect of salinity stresses on tobacco 1. The growth of *Nicotiana tabacum* callus cultures under water, NaCl and Mannitol stress. *Z. Pflanzenphysiol.*, 98:141-143.
- Cooper WC and Gorton BS, 1952. Toxicity and Accumulation of chloride salts in citrus on various rootstocks. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 59, 143-146.
- Cushman JC, DeRocher EJ, Bohnert HJ, 1990. Gene expression during adaptation to salt stress. Zn F Katterman, ed, *Environmental Injury to Plants*. Academic Press, San Diego, CA, pp 173-203.
- Davenport SB, Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML, 2003. Behaviour of antioxidant defense system in the adaptative response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation*, 40, 81–88.
- Fallon KM and Phillips R, 1989. Responses to water stress in adapted and unadapted carrot cell suspension cultures. *Journal of Experimental Botany* 40, 68-687.
- François LE, Mass EV, 1985. Plant responses to salinity: a supplement to an indexed bibliography. U.S. Dep. Agric., ARS-14: 174pp
- Garcia-Sánchez F, Perez-Perez JG, Botia P, Martinez V, 2006. The response of young mandarin trees grown under saline conditions depends on the rootstock. *Europ. J. Agronomy*, 24: 129–139.
- Greenway E and Munns R, 1980. Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Ann. Rev Plant physiol.* 30 (1980) 149-190.
- Hussain S, Luro F, Costantino G, Ollitrault P, Morillon R, 2012. Physiological analysis of salt stress behaviour of citrus species and genera: Low chloride accumulation as an indicator of salt tolerance. *South african Journal of botany*, 81: 103-112.
- Iglesias-prieto R, Beltran VH, Lajeunesse TC, Reyesbonilla H, Thome PE, 2004. Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern Pacific. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271: 1757–1763.
- Koc NK, Bas B, Koc M, Kusek M, 2009. Investigations of *in vitro* selection for salt tolerant lines in sour orange (*Citrus aurantium* L). *Biotechnology* 8, 155–159.
- Kuiper D, Schuit D, Kuiper JC, 1990. Actual cytokinin concentrations in plant tissue as an indicator for salt resistance in cereal. *Plant Soil*, 123 243-245.
- Leone A, Costa A, Tocci M, Grillo S, 1994. Adaptation versus shock response to polyethylene glycol induced low water potential in cultured potato cells. *Plant Physiology* 92, 21-30.
- Levy Y and Syvertsen J, 2003. Irrigation Water Quality and Salinity Effects in Citrus Trees, in *Horticultural Reviews*, Volume 30 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK. doi: 10.1002/9780470650837.ch2.
- Levy Y, Lifshitz J, De Malach Y, David Y, 1999. Response of several citrus genotypes to high-salinity irrigation water. *HortScience*, 34: 878–881.
- Maas EV, 1993. Salinity and citriculture, *Tree Physiol.*, 12 (2): 195–216.
- Moya JL, Gomez-Cadenas A, Primo-Millo E, Talon M, 2003. Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra

- mandarin citrus rootstocks is linked to water use. J. Exp. Bot., 383, 825-833
- Moya JL, Tadeo FR, Gomez-Cadenas A, Primo-Millo E, Talon M, 2002. Transmissible salt tolerance traits identified through reciprocal grafts between sensitive Carrizo and tolerant Cleopatra citrus genotypes. Journal of Plant Physiology 159, 991-998.
- Muralitharan MS, Chandler SF, Van Steveninck RFM, 1992. Effects of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and KCl on growth and ion uptake of callus cultures of *Vaccinium corymbosum* L. cv. Blue Crop. Ann. Bot. 69: 459-465.
- Murashige TD and Tucker DHP, 1969. Growth factor requirements of Citrus tissue culture. Proceedings of the First International Citrus Symposium, Vol 3, University of California, Riverside, pp. 1151-1161.
- Navarro JM, Pérez-Tornero O, Morte A, 2014. Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi depends on the rootstock salt tolerance. J. Plant Physiol. 171, 76e85.
- Noreen Z et Ashraf M, 2009. Assessment of variation in antioxidative defense system in salt treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. J Plant Physiol. 166:1764-1774.
- Ollittraut P, Ollittraut F, Cabasson C, 1992. Induction des callus embryogènes d'agrumes par culture d'ovules. Détermination isoenzymatique de l'origine tissulaire des embryons. Revue Fruit : Numéro spécial agrume (47), pp : 204 - 212.
- Omari FE, Beniken L, Gaboune F, Zouahri A, Benkirane B, Benyahia H, 2012. Effet de la nutrition azotée sur les paramètres morphologiques et physiologiques de quelques porte-greffes d'agrumes. Journal of Applied Biosciences 53: 3773 – 3786 ISSN 1997-5902.
- Pestana M, de Varennes A, Abadi'a J, Faria EA, 2005. Differential tolerance to iron deficiency of citrus rootstocks grown in nutrient solution. Sci. Hortic. 104, 25-36.
- Piqueras A, Olmos E, Hellin E, 1994. Cytological changes related with salt tolerance in embryogenic callus of Citrus limon. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 39, 13-18.
- Rus AM, Panoff M, Perez-Alfocea F, Bolarin MC, 1999. NaCl response in tomato calli and whole plants. J. Plant Physiol. 155: 727-733.
- Sabbah S and Moshe T, 1990. Development of callus and suspension cultures of potato resistant to NaCl and mannitol and their response to stress Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Volume 21, Number 2, Page 119.
- Shah SH, Wainwright SJ, Merrett MJ, 1990. The interaction of sodium and calcium chlorides and light on growth, potassium nutrition and proline accumulation in callus cultures of *Medicago sativa* L. New Phytol. 116: 37-45.
- Shalhevet J et Levy Y, 1990. Citrus trees. In irrigation of agricultural Crops. Eds. B.A. Stewart and D.R. Nielson. Agronomy Monograph 30, Amer. Soc. Agron., Madison, WI, 951-986 pp.
- Simpson CR, Nelson SD, Melgar JC, Jifon J, King SR, Schuster G, Volder A, 2014. Growth response of grafted and ungrafted citrus trees to saline irrigation Original Research Article. Scientia Horticulturae, Volume 169, Pages 199-205.
- Spiegel-Roy P and Ben-Hayyim G, 1985. Selection and breeding for salinity tolerance in vitro. Plant Soil 89:243-252.
- Stavarek SJ and Rains DW, 1984. The development of tolerance to mineral stress. Hort. Sci., 19: 377-382.
- Storey R and Walker RR, 1999. Citrus and salinity. Scientia Horticulturae 78, 30-81.
- Sulistiyowati L and Keane PJ, 1992: Effect of soil salinity and water content on stem rot caused by *Phytophthora citrophthora* and accumulation of phytoalexin in citrus rootstocks. Phytopathology. 82(7): 771-777.
- Sykes SR, 2011. Chloride and sodium excluding capacities of citrus rootstock germplasm introduced to Australia from the People's Republic of China Original Research Article Scientia Horticulturae, Volume 128, Issue 4, 10 May 2011, Pages 443-449.
- Tal M, Heikin H, Dehan K, 1978. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: responses of callus tissue of *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* and *Solanum pennellii* to high salinity. Z Pflanzenphysiol 86: 231-240.
- Termaat A, Passioura J.B., Munns R. 1985. Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl affected wheat and barley. Plant Physiol., 77:869-872.
- Turkan I and Demiral T, 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. Environ. Exp. Bot. 67, 2-9.
- Umiel N, Zahavi E, Chen Y, 1980. Effect of salinity stresses on tobacco, 2. Short term kinetics of

- Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> uptake by callus cultures grown on media containing NaCl. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* Volume 100, Pages 363-367.
- Uno Y, Kanechi M, Inagaki N, Taki N, Maekawa S, 1996. Growth and protein profile responses in the halophyte sea aster (*Aster tripolium* L.) suspension-cultured cells to salinity. *J. Plant. Res.* 109: 409-414.
- Venkataiah P, Christopher T, Subhash K, 2004. Selection and characterization of sodium chloride and mannitol tolerant callus lines of red pepper (*Capsicum annuum* L.) *Plant Physiol. Indian Journal of physiologie végétale*; 9 (2): 158-163.
- Zekri M and Parsons L, 1992. Salinity tolerance of citrus rootstocks: effects of salt on root and leaf mineral concentrations. *Plant and Soil* 147, 171–181.
- Zhu JK, 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247–273.