

## Obtention de plants nucellaires de divers cultivars de clémentiniers au moyen de la culture de nucelle «*in vitro*».

J. JUAREZ, L. NAVARRO et J.L. GUARDIOLA

OBTENTION DE PLANTS NUCELLAIRES DE DIVERS CULTIVARS DE CLÉMENTINIER AU MOYEN DE LA CULTURE DE NUCELLE «*IN VITRO*»

J. JUAREZ, L. NAVARRO et J.L. GUARDIOLA

*Fruits*, dec. 1976, vol. 31, n°12, p. 751-762.

RESUME - Des plants nucellaires de huit cultivars espagnols de clémentinier monoembryonné, contaminés par plusieurs maladies à virus, ont été artificiellement obtenus au moyen de la culture de nucelle «*in vitro*».

La méthode opératoire est décrite dans cet article. Les nucelles mis en culture peuvent : a) ne pas évoluer, b) produire des cals qui, ultérieurement, pourront donner naissance à des embryons, c) former directement des embryons. Les résultats diffèrent selon les cultivars et l'âge des fruits. Vingt pour cent des plants obtenus ont des feuilles morphologiquement différentes de celles du clémentinier. Ceci met en évidence la nécessité d'effectuer une étude agronomique rigoureuse avant d'utiliser dans les vergers commerciaux les plants nucellaires des différents cultivars de clémentinier.

Les divers cultivars de clémentinier constituent le groupe de mandariniers le plus important d'Espagne quant à la superficie cultivée. Celle-ci est proche de 21.000 hectares, ce qui représente un peu plus de 10 p. cent de la superficie totale consacrée aux agrumes, et environ 50 p. cent des plantations de mandariniers (Ministère d'Agriculture, 1973). L'importance économique des différents cultivars de clémentinier justifie amplement l'intérêt prioritaire qui leur est donné dans les programmes de sélection et d'amélioration, en tenant spécialement compte des circonstances suivantes :

a) le mauvais état sanitaire de pratiquement toutes les plantations commerciales de clémentiniers en Espagne, dans lesquelles sont largement répandues les maladies à virus : la tristezza, la psorose, le concave gum, l'exocortis, la

xyloporose (NAVARRO et BALLESTER, données non publiées ; PLANES et al., 1968, 1973) et, probablement l'impetratura (GUARDIOLA et JUAREZ, 1975).

b) on ne dispose pas actuellement de greffons indemnes de maladies à virus, ce qui occasionne, en plus de la diminution de la production, des limitations dans l'utilisation de certains porte-greffe. La seule exception à cette situation est constituée par les lignées sélectionnées à la Station de Recherches agrumicoles de San Giuliano (Corse), certifiées indemnes de maladies à virus connues, dont l'une d'elles, la SRA 63, a atteint une diffusion importante en Espagne, se substituant ainsi au «clémentinier Fina» (clémentinier sans pépin). Cependant, ces lignées ne résolvent pas le problème pour les autres cultivars de clémentinier, parmi lesquels se trouvent le «clémentinier Oroval» et le «clémentinier de Nules», qui, par leurs caractéristiques intéressantes sont largement plantés actuellement.

\* - Ministère d'Agriculture I.N.I.A. Centro de Levante, Burjasot, Valencia, Espagne  
adresse actuelle : Cátedra de Fisiología vegetal, Escuela Técnica superior de Ingenieros Agrónomo, Paseo al Mar, 21 - Valencia, Espagne

Les travaux réalisés pour l'obtention de greffons indemnes de virus par sélection au champ, postérieur à l'indexation (technique utilisée avec un succès relatif avec la variété «Navelina» (GUARDIOLA et al., 1974), n'ont pas donné de résultats positifs. Ceci est logique étant donné que les arbres, sur lesquels sont apparus les cultivars mutants étudiés, se trouvent affectés par diverses maladies virales. Tel est le cas du «clémentinier de Nules», dont l'arbre original est infecté de concave gum, d'exocortis et de xyloporose, et du «clémentinier Oroval», infecté au moins de concave gum et d'exocortis (GONZALEZ-SICILIA et al., 1973). Afin d'obtenir des plantes indemnes de virus des divers cultivars de clémentinier, au «Centro regional de Investigaciones agrarias de Levante» on poursuit simultanément deux lignes de recherche :

a) obtention de plants nucellaires. Le clémentinier est une variété considérée comme strictement monoembryonnée (FROST et SOOST, 1968), bien que parfois elle peut former plus d'un embryon par graine (OZSAN et CAMERON, 1963), fait que nous avons vérifié dans notre travail, mais ces embryons ne sont pas d'origine nucellaire. En conséquence, nous avons dû avoir recours à la technique de culture de nucelle *in vitro* (RANGASWAMY, 1961 ; RANGAN, MURASHIGE et BITTERS, 1968, 1969 ; ESAN, 1973) afin d'induire la formation d'embryons nucellaires.

b) obtention de plantes par micro-greffe d'apex caulinaires *in vitro* (NAVARRO, 1976), technique décrite originellement par MURASHIGE et al., (1972) et postérieurement améliorée et contrôlée par NAVARRO, ROISTACHER et MURASHIGE (1975, 1976) et ROISTACHER, NAVARRO et MURASHIGE (1976).

Dans la présente publication, on décrit les résultats obtenus avec la première des techniques, et l'on donne des détails sur celle-ci. Des résultats préliminaires ont été signalés dans des publications antérieures (GONZALEZ-SICILIA et al., 1973 ; GUARDIOLA, 1974).

## MATÉRIAUX ET MÉTHODES

### Matériel végétal.

Les travaux de sélection et d'obtention de plants nucellaires ont été réalisés sur huit cultivars de clémentinier, quelques-uns d'une valeur commerciale confirmée, et d'autres d'apparition plus récente qui, de par certaines de leurs caractéristiques, peuvent présenter un intérêt commercial futur. Tous ces cultivars produisent des fruits aspermes.

### Clémentinier «Fina».

Nous réunissons sous ce nom toutes les lignées de clémentinier produisant des fruits sans pépin ayant des caractéristiques similaires à la clémentine d'Algérie. Dans

ce groupe, il existe apparemment une grande hétérogénéité dans la productivité et la qualité des fruits, bien que, commercialement on ne différencie pas les différentes lignées possibles. Dans ce travail, nous avons utilisé deux lignées, une de caractéristiques «standard» et une autre à parthénocarpie naturelle élevée.

### Clémentinier «Fina».

Cultivar de caractéristiques similaires au précédent mais il s'en différencie par son fruit à peau plus fine et plus adhérente aux segments ; la saveur du fruit n'est pas aussi agréable que celle du clémentinier «Fina». Actuellement, ce cultivar n'est pas cultivé sur une grande échelle.

### Clémentinier «de Nules».

Ce cultivar se différencie du clémentinier «Fina» par l'aspect plus touffu de l'arbre, des feuilles plus grandes, sa plus grande capacité de parthénocarpie naturelle, la maturation plus précoce des fruits et la plus grande taille de ceux-ci. Le changement de couleur de la peau des fruits a lieu après la maturation interne commerciale de celui-ci, et la réponse au déverdissement avec de l'éthylène n'est pas aussi effective que pour d'autres variétés.

### Clémentinier «Reina».

Cultivar très similaire au précédent auquel il est très difficile de le distinguer. Il semblerait que les deux variétés aient la même origine.

### Clémentinier «Oroval».

De caractéristiques similaires au clémentinier «de Nules», il s'en différencie cependant par un port nettement plus érigé de la frondaison, la forme plus arrondie des fruits, et la coloration plus précoce de leur peau. Ce dernier avantage s'estompe au moment de la maturation. La qualité des fruits est semblable. La saveur de ces deux cultivars est un peu moins douce et aromatique que chez le clémentinier «Fina».

### Clémentinier «Tomatera».

Cultivar de maturité précoce, présentant un fruit d'une taille comparable ou supérieure à celui du clémentinier «de Nules», et d'une couleur rougeâtre plus intense à laquelle se réfère son nom. Ce cultivar est actuellement peu répandu.

### Clémentinier «Borrull».

Cultivar de maturité très précoce pouvant se commercialiser au début de septembre, très souvent un mois avant le clémentinier «Fina». Il présente une capacité de parthénocarpie naturelle élevée avec une tendance à la production de fruits en grappes. Les fruits sont de saveur excellente, mais leur conservation sur l'arbre est de très courte durée.

*Clémentinier «Tardia».*

Cultivar de maturité tardive, qui a lieu à la fin de décembre, bien que le fruit puisse se conserver sur l'arbre, en parfaites conditions, jusqu'à la mi-février et même la fin février. Il se différencie du clémentinier «Fina» par l'époque de maturité ainsi que par la plus grande taille des fruits et par la couleur nettement plus foncée du bois. Une lignée de ce cultivar est en train de se propager commercialement sous le nom de «Hernandina».

**Obtention de graines.**

Nous avons sélectionné un ou plusieurs arbres de chacun des cultivars étudiés, en se conformant aux critères décrits pour la «Navelina» (GUARDIOLA et al., 1975), c'est-à-dire en tenant strictement compte des caractéristiques variétales et en retenant aussi quelques particularités désirables quand elles se présentent comme un haut degré de parthénocarpie naturelle. Le nombre d'arbres étudiés par cultivar est donné dans le tableau 1.

Tous les cultivars étant aspermes dans les conditions naturelles à cause de leur incompatibilité entre le pollen et le style, il a été nécessaire d'induire la formation des graines

TABLEAU 1 - Cultivars utilisés pour la culture de nucelles *in vitro*.

Cultivars	Nombre d'arbres
<i>Citrus reticulata</i> BLANCO	
clémentinier «Fina»	2
Clemenfina	1
clémentinier «de Nules»	3
clémentinier «Reina»	1
clémentinier «Oroval»	2
clémentinier «Tomatera»	1
clémentinier «Borrull»	1
clémentinier «Tardia»	2

par une pollinisation manuelle avec du pollen d'oranger *Citrus sinensis* (L.) OSBECK var. *comuna* ; ceci se révéla très efficace dans tous les cas, tant en ce qui concerne l'induction de la formation de graines, étant donné que l'on obtint une moyenne de 10 à 15 pépins par fruit, que pour la nouaison, qui a été au moins de 30 p. cent par rapport aux fleurs pollinisées.

Les fruits obtenus de cette façon ont été récoltés d'une façon échelonnée, entre la treizième et la quinzième semaine après la pollinisation et furent utilisés pour le prélèvement et la culture de nucelle.

**Prélèvement des nucelles.**

Immédiatement après la cueillette, les fruits furent portés

au laboratoire et on en stérilisa la surface avec une solution d'hypochlorite de sodium à 1 p. cent pendant vingt minutes. Puis on les ouvrit dans des conditions aseptiques sous une hotte à flux lumineuse d'air stérile. Les graines immatures une fois extraites furent placées dans des boîtes de Pétri stériles.

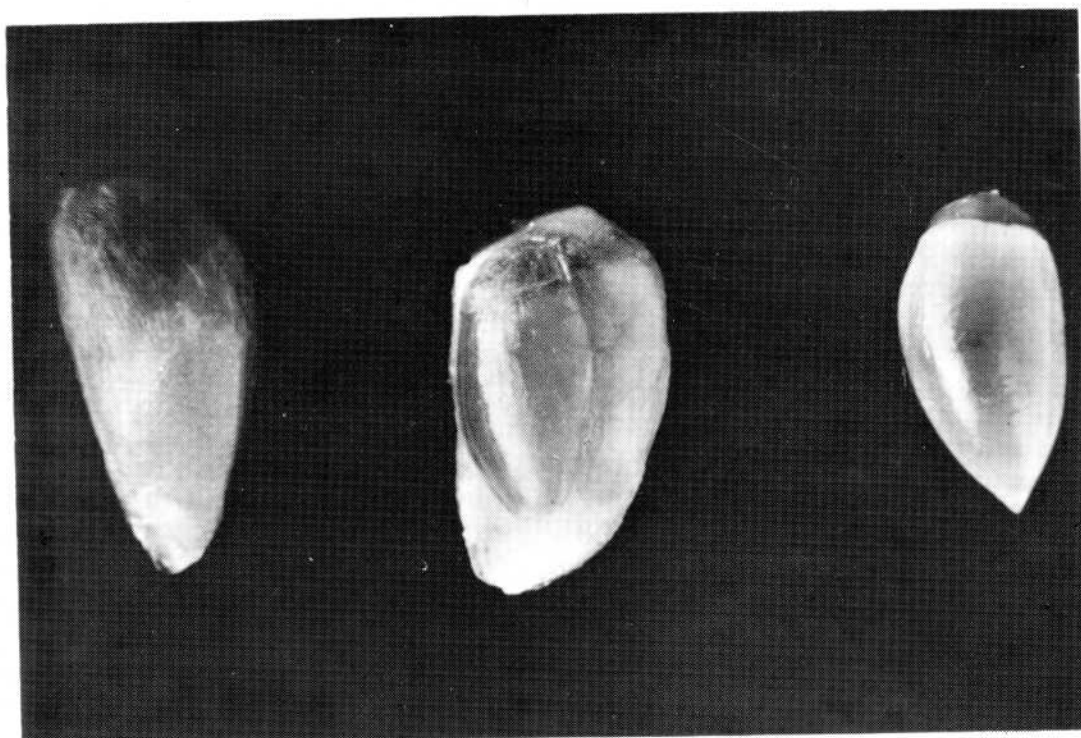
Le prélèvement des nucelles fut réalisé suivant deux techniques distinctes, toutes deux avec l'aide d'un microscope binoculaire et divers instruments de microdissection. Avec la première technique, les graines furent coupées longitudinalement et l'on prit de leur intérieur un morceau de nucelle. Dans l'autre, on réalisa une coupe longitudinale des téguments de la graine sans blesser le nucelle. On élimina ensuite les téguments et l'on pratiqua une incision transversale dans le nucelle pour extraire l'embryon zygotique (photos 1 et 2). Avec cette seconde technique, on réalisa une culture de nucelles entières, sans autre traumatisme que la coupe transversale nécessaire à l'élimination de l'embryon zygotique, tandis qu'avec la première, on n'effectue la culture que d'un segment de nucelle.

L'évolution des nucelles *in vitro* se produit avec les deux techniques. Cependant, nous avons observé une grande variabilité dans l'embryogénèse des segments de nucelle, ce qui nous a fait adopter la culture de nucelles entières pour le travail de routine du laboratoire, bien que le prélèvement soit plus difficile à réaliser. Toutes les données que l'on présente dans ce travail ont été obtenues au moyen de cette dernière méthode.

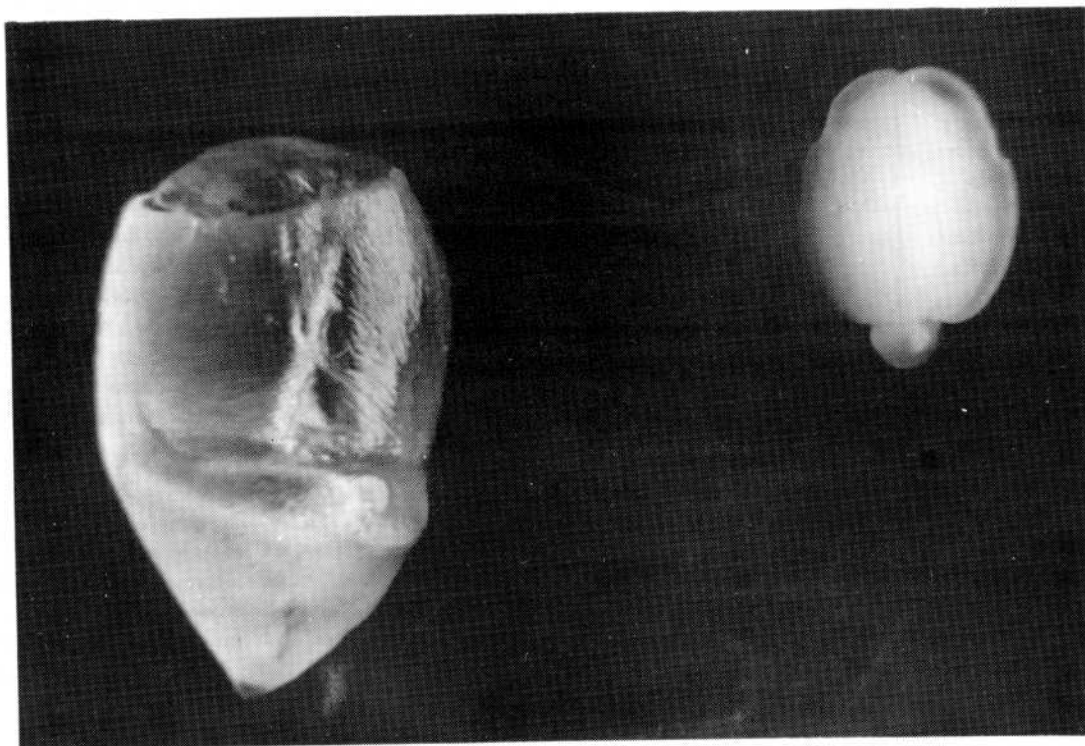
**Méthode de culture.**

Le milieu de culture était constitué par les sels minéraux de MURASHIGE et SKOOG (1962), additionnés d'inositol (100 mg/l) de chlorhydrate de thiamine (0,2 mg/l), d'acide nicotinique (1 mg/l) de chlorhydrate de pyridoxine (1 mg/l), d'extrait de malt (500 mg/l) et de saccharose (50 g/l) (RANGAN, MURASHIGE et BITTERS, 1968 ; 1969). On ajusta le pH à l'aide d'une solution de soude 1N jusqu'à une valeur de  $5,7 \pm 0,1$  et l'on ajoute de l'agar Bacto (10 g/l) que l'on fit fondre en autoclave à 121°C pendant cinq minutes. On distribua ensuite le milieu en portions aliquotes de 25 ml dans des tubes à essai de 25 x 150 mm, qui furent stérilisés en autoclave à 121°C pendant quinze minutes.

On introduisit un nucelle dans chaque tube dans des conditions aseptiques, en position verticale avec la chalazie plongée dans le milieu de culture. Les tubes furent maintenus dans une chambre climatisée à 27°C, illuminée pendant seize heures par jour avec une intensité de 1.000 lux au niveau des cultures, à l'aide de lampes du type Gro-Lux de Sylvania.



**Photo 1.** Prélèvement de la nucelle. Gauche : graine immature de «Clementina Fina» ; au centre : graine de laquelle on a éliminé une partie des téguments, montrant la nucelle à l'intérieur ; à droite : nucelle.



**Photo 2.** Élimination de l'embryon zygotique. A gauche : nucelle préparée pour la culture à laquelle on a effectué une incision transversale par laquelle on a extrait l'embryon zygotique ; à droite : embryon zygotique.

### Développement des plantes.

Lorsque les embryons se formèrent, on provoqua leur développement dans le même milieu utilisé pour la culture des nucelles jusqu'à ce que la tige des plantes atteigne une dimension proche aux 3 cm. A ce moment là, ces dernières furent transplantées en terre. La méthode de transplantation fut similaire à celle décrite par NAVARRO, ROISTACHER et MURASHIGE (1975). Elle consista à placer les plantules dans des pots de 13 cm de diamètre remplis d'un sol artificiel composé par de la tourbe (50 p. cent) et du sable (50 p. cent), auquel on avait ajouté un fertilisant de fond contenant du phosphore, du calcium, du magnésium et des microéléments (NAUER, ROISTACHER et LABANAUSKAS, 1968) ; le pH fut ajusté à 6 avec du carbonate de calcium et le mélange terreux fut stérilisé à la vapeur à 100 °C pendant une heure. Après la transplantation, on arrosa les plantules avec la solution de sels minéraux de MURASHIGE et SKOOG (1962) et on introduisit les pots dans des sacs en plastique que l'on ferma afin d'éviter la dessiccation des plantules. Les pots furent placés dans les conditions de culture décrites précédemment. Au bout de dix jours les sacs furent ouverts et, après dix autres jours, les pots furent sortis des sacs et placés dans des conditions de serre.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'embryon zygotique est nettement visible (photo 2) dans toutes les graines observées, sans que dans aucun cas nous ayons trouvé, au moyen d'observations histologiques, des preuves de l'initiation d'embryons adventifs. L'état de développement des embryons zygotiques dépend du temps passé depuis la pollinisation ; ceux obtenus de fruits de treize semaines après la pollinisation ont une forme globulaire ou de coeur, tandis que ceux provenant de fruits de quinze semaines ont les cotylédons nettement développés, avec une taille comprise entre 2 et 5 millimètres. Le développement de l'embryon des cultivars de clémentinier étudiés est donc plus rapide que pour le citronnier «Ponderosa», le mandarinier «Temple» et le pamplemousse, espèces pour lesquelles l'embryon se trouve à l'état globuleux ou de coeur dix-sept semaines après la pollinisation (RANGAN, MURASHIGE et BITTERS, 1968). Ceci concorde avec la plus grande précocité des clémentiniers bien que les différences climatiques peuvent avoir contribué au moins en partie, aux différences constatées. Dans les cultures «*in vitro*» de nucelles de clémentinier, on obtient trois types de réponse :

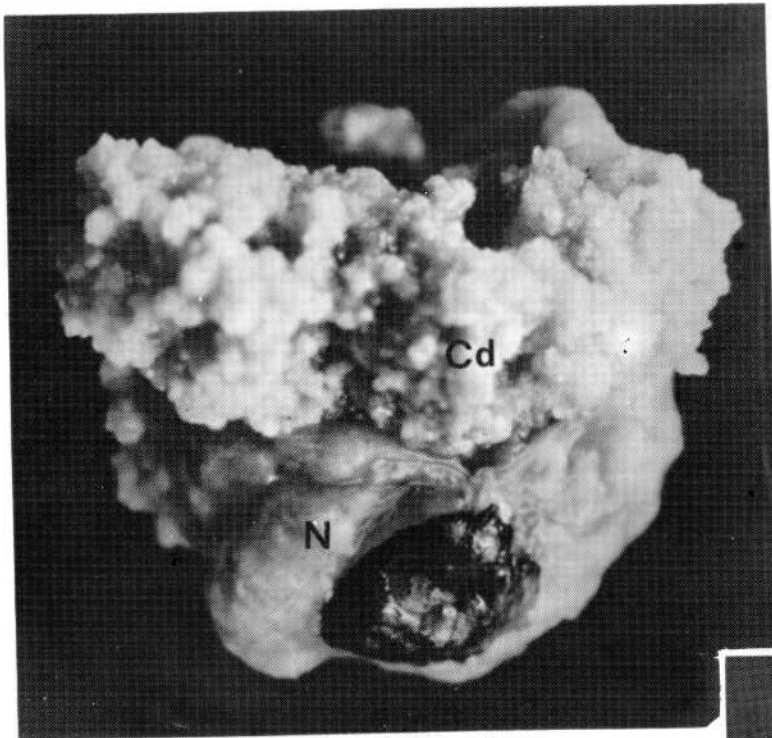
- a) nucelles qui n'évoluent pas
- b) nucelles qui produisent des cals qui, postérieurement, peuvent donner naissance à des embryons,
- c) nucelles qui forment directement des embryons.

Les nucelles qui évoluent (dans ce groupe étant inclus ceux qui forment des cals comme ceux qui produisent directement les embryons), le font pendant la phase précoce de la culture ; approximativement 95 p. cent des nucelles se développent pendant les cinq premières semaines de la culture, observation similaire à celle effectuée par ESAN (1973) chez trois variétés distinctes. On peut donc, d'une façon pratique, rejeter les nucelles qui n'ont pas évolué pendant ce temps.

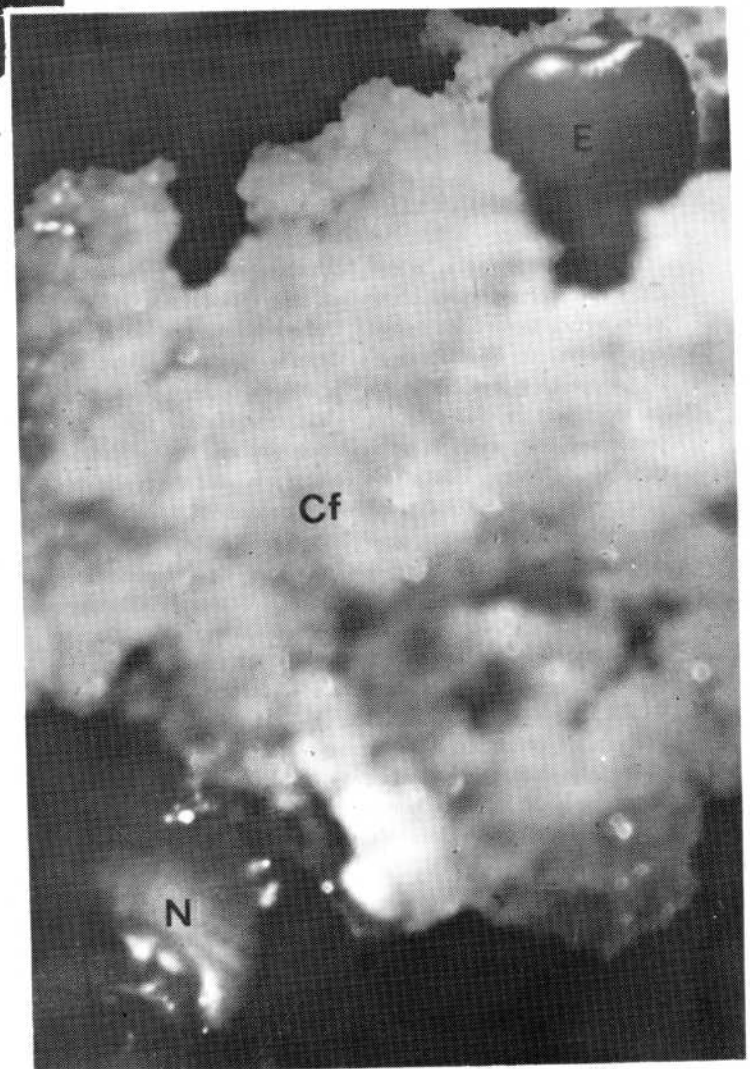
La formation de cals a été préalablement signalée dans la culture de nucelles de variétés polyembryonnées (RANGASWAMI, 1961 ; SABHARWAL, 1963 ; SINGH, 1963), mais ce fait n'a pas été observé dans des cultures de nucelles de variétés monoembryonnées (RANGAN, MURASHIGE, et BITTERS, 1968 ; 1969 ; BITTERS et al., 1970 ; ESAN, 1973). Leur formation s'observe généralement au bout de trois ou quatre semaines de culture. Une masse de tissu blanc apparaît dans la région du micropyle et prolifère rapidement en couvrant la plus grande partie du nucelle. Initialement, le cal est friable, mais généralement il se durcit au bout de peu de temps de culture en prenant une couleur brune (photo 3), bien que parfois le cal initial continue à se diviser sans perdre sa condition friable. A l'intérieur de ce dernier, des embryons se différencient (photo 4). Les cals durcis continuent à croître lentement après avoir été repiqués et produisent un nouveau cal ayant les mêmes caractéristiques que ceux qui ne produisent pas d'embryons. Cependant, approximativement 15 p. cent de ces cals produisent un nouveau cal friable (photo 5) semblable à celui formé initialement par le nucelle, dans lequel apparaissent des formations globuleuses (pseudobulbi) qui postérieurement donneront des embryons.

La formation directe d'embryons se produit exclusivement dans la région du micropyle. Dans ce secteur, au bout de trois à quatre semaines de culture, on observe une petite masse de tissu de couleur verte qui évolue rapidement. Après cinq semaines de culture on peut nettement distinguer les embryons (photo 6). Les observations histologiques montrent que ces embryons, qui peuvent se présenter au nombre de un ou de plusieurs par nucelle, s'initient en général à l'intérieur de la culture, qu'ils cassent en grandissant et en émergeant à l'extérieur.

Lorsqu'on repique les nucelles et embryons dans un milieu ayant la même composition que le milieu initial, il se produit une rapide prolifération d'embryons par des processus de gemmation (ESAN, 1973). Ce phénomène donne lieu à un nombre élevé d'embryons (photo 7), ayant une multitude de formes et de tailles. Certains d'entre eux ont des cotylédons de formes anormales, avec plus de deux cotylédons ou avec des cotylédons de différentes tailles. Des phénomènes similaires ont été signalés préalablement par

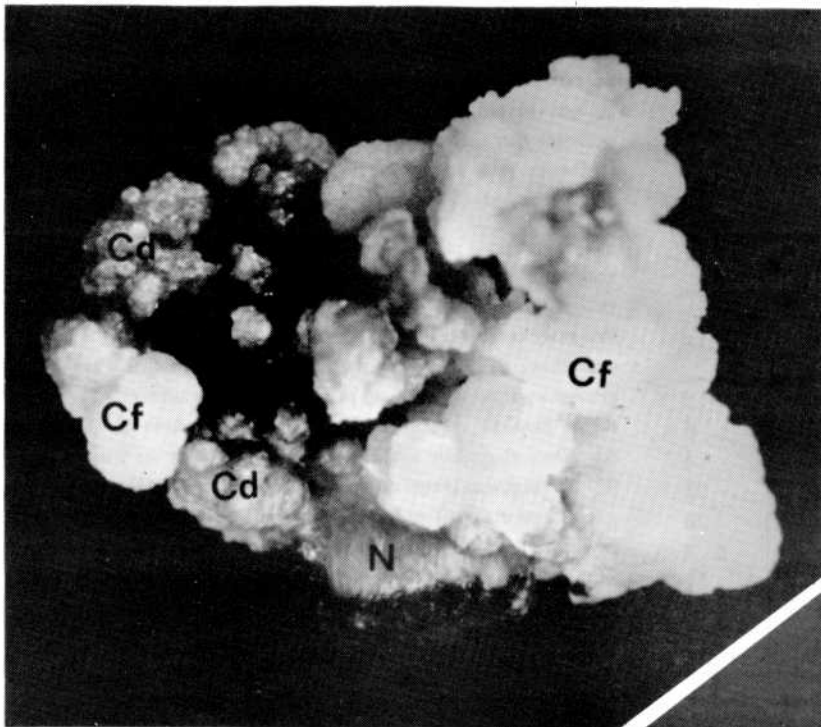


**Photo 3.** Cal durci formé par une nucelle de «Clementina Fina».  
Cd = cal durci ; N = nucelle.



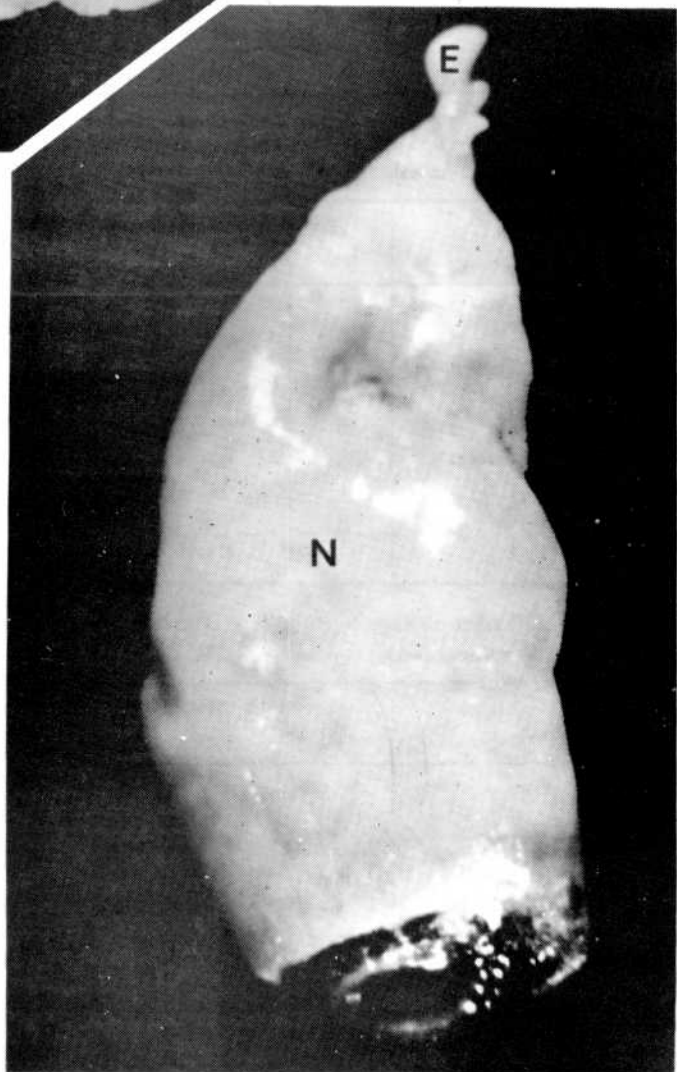
**Photo 4.** Nucelle de «Clementina Tardía» qui a formé un cal friable dans lequel s'est différencié l'embryon.

N = nucelle.  
Cf = cal friable ; E = embryon ;



**Photo 5.** Cal durci formé par une nucelle de «Clementina Fina», qui a initié la formation de cal friable après son repiquage dans un milieu frais.

Cd = cal durci ; Cf = cal friable ; N = nucelle.



**Photo 6.** Nucelle de «Clementina de Nules» au bout de cinq semaines de culture dans laquelle on peut observer l'embryon nucellaire produit *in vitro*.

E = embryon ; N = nucelle.

d'autres auteurs (RANGAN, MURASHIGE et BITTERS, 1968 ; 1969 ; BITTERS et al., 1970 ; ESAN, 1973).

L'influence de l'âge du fruit sur l'évolution des nucelles en culture est présentée dans les tableaux 2, 3 et 4. On

**TABLEAU 2 - Influence de l'âge du fruit dans le pourcentage de nucelles qui forment directement des embryons.**

Cultivars	âge du fruit (semaines)		
	13	14	15
clementinier «Fina»	13	24	12
Clemenfina	31	6	6
clementinier «Oroval»	11	16	14
clementinier «de Nules»	8	17	21
clementinier «Reina»	28	11	20
clementinier «Tomatera»	30	9	8
clementinier «Borrull»	---	0	17
clementinier «Tardia»	25	31	16
moyenne	21	14	14

**TABLEAU 3 - Influence de l'âge du fruit sur le pourcentage de nucelles qui forment un cal.**

Cultivars	âge du fruit (semaines)		
	13	14	15
clémentinier «Fina»	17	49	79
Clemenfina	6	89	88
clémentinier «de Nules»	57	70	73
clémentinier «Reina»	67	85	70
clémentinier «Oroval»	50	76	67
clémentinier «Tomatera»	50	85	89
clémentinier «Borrull»	---	46	83
clémentinier «Tardia»	14	34	75
moyenne	42	67	76

**TABLEAU 4 - Influence de l'âge du fruit sur le pourcentage de nucelles qui n'évoluent pas en cours de culture.**

Cultivars	âge du fruit (semaines)		
	13	14	15
clémentinier «Fina»	68	48	9
Clemenfina	62	6	6
clémentinier «de Nules»	34	12	5
clémentinier «Reina»	4	4	10
clémentinier «Oroval»	39	8	19
clémentinier «Tomatera»	20	7	3
clémentinier «Borrull»	---	54	0
clémentinier «Tardia»	61	35	9
moyenne	41	16	9

observe une grande variabilité dans le comportement des différents cultivars, particulièrement dans le pourcentage de nucelles qui forment directement des embryons (tableau 2) ou un cal (tableau 3). En général, le pourcentage de nucelles qui n'évoluent pas en culture est plus élevé avec les fruits les plus jeunes (âgés de 13 semaines) par rapport à ceux plus âgés (15 semaines).

Ce manque d'uniformité dans l'embryogénèse directe confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs. Ainsi, tandis que ESAN (1973) ne trouva pas de différences pour des nucelles de cédratier «Ethrog» de fruits âgés de 11 à 21 semaines, BITTERS et al., (1970) signalent que l'embryogénèse *in vitro* à partir de nucelles de mandarinier «Temple» ne se produit que lorsque les fruits sont âgés de 10 à 18 semaines et qu'elle est à son maximum pour les fruits de 10 à 12 semaines. Dans notre étude, l'embryogénèse augmente avec l'âge du fruit entre la treizième et la quinzième semaines pour les cultivars clémentinier «de Nules» et «Borrull», diminue pour la «Clemenfina», et les clémentiniers «Tardia» et «Tomatera» et ne montre pas de variations régulières chez les autres cultivars (tableau 2).

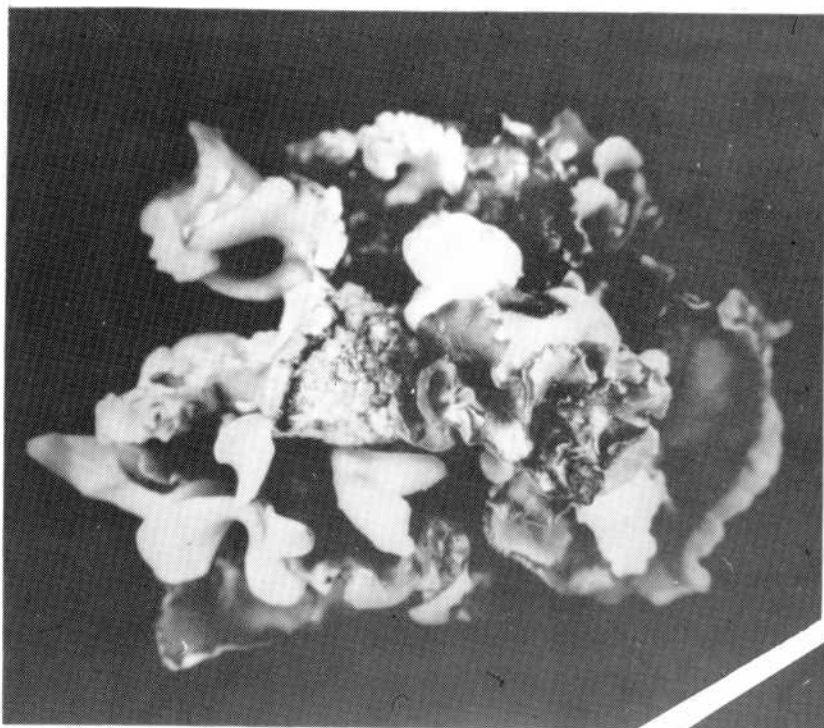
L'accroissement dans le pourcentage de nucelles qui évoluent avec l'âge du fruit (tableau 4) est dû essentiellement à la plus grande production de cals (tableau 3).

On observe également des différences marquées dans le pourcentage de nucelles qui évoluent chez les différents cultivars, qui est notablement plus grand chez le clémentinier «Tomatera» et le clémentinier «Reina» que chez les autres (tableau 4). Il faut remarquer à ce sujet le comportement différent des clémentiniers «de Nules» et «Reina», cultivars qui morphologiquement sont très semblables sinon identiques.

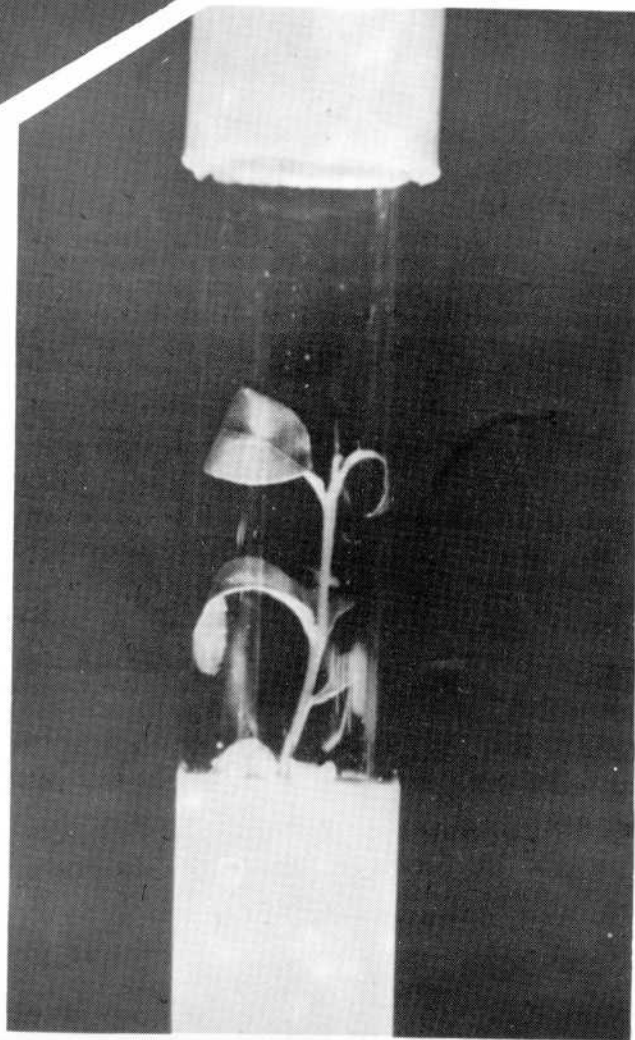
Le développement ultérieur des embryons obtenus et la formation de nouvelles plantes a lieu seulement si on les repique sur un milieu frais et en plaçant un seul embryon par tube d'essai ; de cette façon, environ 50 p. cent de ceux-ci produisent des plantes au bout de 6 à 8 semaines (photo 8), tandis que le reste prolifère en donnant naissance à une nouvelle masse d'embryons.

Avec la méthode de transplantation en terre utilisée, plus de 90 p. cent des plants survivent, ce qui contraste avec les chiffres élevés de mortalité signalés par d'autres auteurs (BITTERS et al., 1970 ; BUTTON et BORNMAN, 1971). Ces plants nucellaires qui ont actuellement une taille comprise entre 10 et 40 cm de haut (photo 9) sont cultivés d'une façon forcée sous serre et l'on a entrepris leur propagation afin de procéder à leur vieillissement dans des conditions de plein champ et effectuer leur indexation pour vérifier l'absence des maladies à virus présentes dans les plantes d'origine. Bien que la transmission de maladies à virus par graines n'ait pas été signalée pour les agrumes, chez les citranges «Troyer» (PUJOL, 1966) et «Carrizo»





**Photo 7.** Masse d'embryons produite par une nucelle de «Clementina de Nules» cultivée *in vitro* pendant huit semaines.



**Photo 8.** Plante de «Clementina Fina» âgée de douze semaines obtenue par culture de nucelles *in vitro* et en conditions d'être transplantée au sol.



**Photo 9.** Vue de plantes obtenues par culture de nucelles de différentes variétés de clémentinier.



**Photo 10.** Plantes nucellaires de «Clementina Fina». A gauche : plante normale ; au centre et à droite , plantes anormales.

(CHILDS et JOHNSON, 1960 ; BRIDGES, YOUTSEY et NIXON, 1965) ainsi que chez le *Poncirus trifoliata* (CAMPAGLIA et SALIBE, 1976), on a signalé la transmission de la psorose par graine. En conséquence, le bon état sanitaire des plants nucellaires doit être démontré et non supposé.

L'observation rigoureuse des caractéristiques morphologiques des plants nucellaires obtenus a mis en évidence une grande variabilité de ceux-ci. Environ 20 p. cent des plants présentent des caractères anormaux par rapport aux feuilles typiques de chaque cultivar, comme des feuilles en forme de coeur, arrondies, ou avec deux folioles (photo 10). Nous n'avons trouvé aucune relation entre l'origine des embryons, obtenus par formation directe à partir du nucelle, par différenciation d'un cal friable ou par division (gemination) d'autres embryons préexistants, et la fréquence de ces altérations ; de plus, dans le cas où on a obtenu plus d'un plant à partir d'un nucelle ou d'un cal, tous présentent des caractéristiques identiques, ce qui indique que les modifications peuvent avoir eu lieu non pas pendant le processus d'embryogénèse mais dans l'arbre, sous forme de variation dans la gemination ou pendant la formation des ovules. Des variations phénotypiques chez les plants nucellaires de la même origine ont été signalées maintes fois (FROST, CAMERON et SOOST, 1957 ; SOOST et CAMERON, 1961) et IGLESIAS, LIMA et SIMON, 1974) ont trouvé certaines différences dans les embryons nucellaires provenant de la même graine, qui se reflètent dans les zimogrammes de l'enzyme peroxidase.

Ces observations montrent nettement que quelques variations génétiques peuvent se produire pendant l'embryogénèse «*in vivo*», et expliquent nos résultats si l'embryon ou le cal qui se forme «*in vitro*» est issu d'une seule cellule, ce que nous n'avons pas pu établir.

La présence de ces anomalies morphologiques nécessite, d'une façon absolue, l'étude agronomique des plants obtenus avant de procéder à leur utilisation. De plus, la présence de caractères juvéniles impose une limitation, par ailleurs déjà connue, à l'emploi de cette technique pour l'amélioration sanitaire des agrumes, en raison que le temps nécessaire entre l'obtention des plants et leur utilisation est supérieur à dix ans.

L'emploi de la technique de microgreffe d'apex caulinaires (NAVARRO, ROISTACHER et MURASHIGE, 1975) évite en grande partie les inconvénients de l'utilisation des plants nucellaires dans l'amélioration des agrumes et les méthodes doivent s'employer de façon complémentaire.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur reconnaissance à Mme Carmen ORTEGA pour sa collaboration technique dans la réalisation du travail, à M. Luis Fernandez DE CORDOVA pour la prise d'échantillons de fruits et à M. Felix BIMBO pour son aide dans la réalisation des photographies.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BITTERS (W.P.), MURASHIGE (T.), RANGAN (T.S.) et NAUER (E.). 1970.  
Investigations on established virus-free plants through tissue culture. *Calif. Citrus Nurserymen's Soc.*, 9, 27-30.
- BRIDGES (G.D.), YOUTSEY (C.D.) et NIXON (R.R.). 1965.  
Observations indicating psorosis transmission by seed of Carrizo citrange. *Proc. Florida State Hort. Soc.*, 78, 48-50.
- BUTTON (J.) et BORNMAN (C.H.). 1971.  
Development of nucellar plants from unfertilized ovules of the Washington navel orange through tissue culture. *Citrus Grow. and Subtrop. Fruit J.* septembre, 11-14.
- CAMPAGLIA (H.G.) et SALIBE (A.A.). 1976.  
Psorosis transmission through seeds of trifoliolate orange. *Proc. 7th Conf. Intern. Org. Citrus Virol.*, (sous presse).
- CHILDS (J.F.L.) et JOHNSON (R.E.). 1966.  
Preliminary report of seeds transmission of psorosis virus. *Plant Dis. Rept.*, 51, 81-83.
- ESAN (E.B.). 1973.  
A detailed study of adventive embryogenesis in the rutaceae. *Ph. D. Thesis University of California, Riverside.*
- FROST (H.B.), CAMERON (J.W.) et SOOST (R.K.). 1975.  
Diversity among nucellar-seedlings lines of Satsuma mandarin and differences from the parental old line. *Hilgardia*, 27, 201-222.
- FROST (H.B.) et SOOST (R.K.). 1968.  
Seed reproduction : development of gametes and embryos. «*The Citrus Industry*». Ed. W. Reuther, L.D. Batchelor and H.J. Webber, vol. II, 290-324. Univ. of California.
- GONZÁLEZ-SICILIA (E.), BONO (R.), GUARDIOLA (J.L.) et SÁNCHEZ-CAPUCHINO (A.). 1973.  
Selección de material exento de virus. *Actas I Congreso Mundial de Citricultura, Murcia (Espagne)* (sous presse).
- GUARDIOLA (J.L.). 1974.  
Selección de material de injerto en los agrios. *ITEA*, 16, 54-59.
- GUARDIOLA (J.L.), BONO (R.), ZARAGOZA (S.), SOLER (J.) et GONZÁLEZ-SICILIA (E.). 1974.  
Caracterisation et sélection sanitaire de la variété d'orange Navelina. *Fruits*, 29, 661-669.
- GUARDIOLA (J.L.) et JUÁREZ (J.). 1975.  
El estado nutricional en boro de los agrios en relación con la presencia de bolsas de goma en el fruto. *Anales Inst. Nal. Inves. Agrar. Serie Producción vegetal*, 5, 111-145.
- IGLESIAS (L.), LIMA (H.) et SIMON (J.P.). 1974.  
Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus. *Journal Hered.*, 65, 81-84.

- Ministerio de Agricultura. 1973.  
El cultivo de los agrinos en España. Situación en 1971. Avance del censo agrícola.  
*Ministerio de Agricultura. Secretaria general Técnica. Madrid.*
- MURASHIGE (T.), BITTERS (W.P.), RANGAN (E.M.), NAUER (E.M.), ROISTACHER (C.N.) et HOLLIDAY (B.P.). 1972.  
A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones.  
*Hort Science*, 7, 118-119.
- MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.). 1962.  
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.  
*Physiol Plant.*, 15, 473-497.
- NAVARRO (L.). 1976.  
The Citrus variety improvement program in Spain.  
*Proc. 7th. Conf. Intern. Organization Citrus Virol. (sous presse).*
- NAVARRO (L.) et BALLESTER (J.F.).  
Données non publiées.
- NAVARRO (L.), ROISTACHER (C.N.) et MURASHIGE (T.). 1975.  
Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free Citrus.  
*J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 100, 471-479.
- NAVARRO (L.), ROISTACHER (C.N.) et MURASHIGE (T.). 1976.  
Effect of size and source of shoot-tips on psorosis A and exocortis contents of Navel orange plants obtained by shoot-tip grafting *in vitro*.  
*Proc. 7th. Conf. Intern. Organization Citrus Virol. (sous presse).*
- NAUER (E.M.), ROISTACHER (C.N.) et LABANAUSKAS (C.K.). 1968.  
Growing citrus in modified UP potting mixtures.  
*Calif. Citrog.*, 53, 456, 458, 460-461.
- OZSAN (M.) et CAMERON (J.W.). 1963.  
Artificial culture of small citrus embryos, and evidence against nucellar embryony in highly zygotic varieties.  
*Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 82, 210-216.
- PLANES (S.), MARTI (F.), FUERTES (C.), GARCIA (J.) et APARICIO (M.). 1968.  
Exocortis in the citrus area of Valencia.  
*J.F.L. Childs (ed.), Proc. 4th Conf. Intern. Organization Citrus virol.*, p. 100-101. Univ. Florida Press, Gainesville.
- PLANES (S.), MARTI (F.) et FUERTES (C.).  
Exocortis and xyloporosis in the citrus area of Valencia.  
*Actas I Congreso Mundial de Citricultura, Murcia (Espagne) (sous presse).*
- PUJOL (A.R.). 1966.  
Transmisión de psoriasis a través de la semilla de citrange Troyer.  
*INTA. Estación Experimental Agropecuaria. Concordia, Serie Técnica n°10.*
- RANGAN (T.S.), MURASHIGE (T.) et BITTERS (W.P.). 1968.  
*In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic Citrus.  
*Hort-Science*, 3, 226-227.
- RANGAN (T.S.), MURASHIGE (T.) et BITTERS (W.P.). 1969.  
*In vitro* studies of zygotic and nucellar embryogenesis in Citrus.  
*Proc. Ist. Intern. Citrus Symposium*, 1, 225-229.
- RANGASWAMI (N.S.). 1961.  
Experimental studies of female reproductive structures of Citrus microcarpa.  
*Phytomorph.*, 11, 109-127.
- ROISTACHER (C.N.), NAVARRO (L.) et MURASHIGE (T.). 1976.  
Recovery of citrus cultivars free of several viruses, exocortis viroid and *Spiroplasma citri* by shoot-tip grafting *in vitro*.  
*Proc. 7th. Conf. Intern. Organization Citrus Virol. (sous presse).*
- SABHARWAL (P.S.). 1963.  
*In vitro* culture of ovules, nucelli and embryos of Citrus reticulata BLANCO var. Nagpura.  
*Plant tissue and organ culture*, p. 265-274.  
Ed. P. Maheshwari y N.S. Ranga Swami. Delhi.
- SINGH (U.R.). 1963.  
Raising nucellar-seedlings of some rutaceae *in vitro*.  
*Plant tissue and organ culture*, p. 275-276.  
Ed. P. Maheshwari et N.S. Ranga Swami, Delhi.
- SOOST (R.K.) et CAMERON (J.W.). 1961.  
Fruit characters in young trees of long-established nucellar lines.  
*W.C. Price (ed.), Proc. Second Conf. Intern. Organization Citrus Virol.* p. 8-14. Univ. Florida Press, Gainesville.

