

Premières informations sur la germination des graines de bigaradier (*Citrus aurantium* L.).

S. DEMNI et S. BOUZID*

PREMIERES INFORMATIONS SUR LA GERMINATION DES GRAINES DE BIGARADIER (*CITRUS AURANTIUM* L.)

S. DEMNI et S. BOUZID

Fruits, avril 1979, vol. 34, n° 4, p. 283-287

RESUME - L'ensemencement en conditions aseptiques sur milieu nutritif gélosé de graines de bigaradier (*Citrus aurantium* L.) a permis de mettre en évidence le rôle inhibiteur des enveloppes séminales sur la germination et de préciser le degré de polyembryonnie de ces graines.

Quelques aspects de la morphogénèse normale et des perturbations provisoires dans le fonctionnement de l'information héréditaire durant les premiers stades du développement *in vitro* sont également abordés.

Les graines de bigaradier, comme celles de la plupart des autres espèces du genre *Citrus* se caractérisent par la présence, à l'intérieur de leurs téguments, en plus de «l'embryon»^{**} sexué, d'un ou de plusieurs embryons somatiques provenant d'un bourgeonnement du nucelle. Ces embryons sont de nombre, de taille et de morphologie très variables (figure 1).

Dans les conditions naturelles, seuls les embryons de grande taille (supérieurs à 5 mm) se développent en jeunes plantes. Ceux de petite taille, se gonflent, émettent parfois une petite racine mais sont incapables de poursuivre leur développement. Une compétition semble s'établir entre ces différents embryons d'une part, et entre ces mêmes embryons et l'embryon sexué d'autre part. Les auteurs s'accordent à reconnaître au plus gros embryon une origine nucel-

laire ; il semble, en effet, que les embryons nucellaires soient plus vigoureux et évincent fréquemment, dès les premiers stades de l'embryogénèse, l'embryon sexué.

Nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce travail, à l'amélioration des conditions de germination des graines en essayant de hâter leur germination. Le degré de polyembryonnie de ces graines a été également précisé. L'obtention de jeunes plants de semis «*in vitro*» nous a permis d'aborder quelques aspects de la morphogénèse de ces végétaux.

INFLUENCE DES TEGUMENTS SUR LA VITESSE DE GERMINATION

Des graines ont été extraites de fruits mûrs de bigaradier provenant du domaine expérimental de l'Institut national de la Recherche agronomique de Tunisie à la Soukra, lavées à l'eau pour les débarrasser de leur mucilage, stérilisées par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium à 90 g/l pendant 20 mn, puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile et réparties en quatre lots de soixante graines.

* - Laboratoire de Biologie végétale (Programme Biologie des Plantes utiles), Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie. Laboratoire de Morphologie végétale et expérimentale associé au CNRS. Université de Paris Sud, Centre d'Orsay, 91405 Orsay, France.

** - embryon : le terme signifie en réalité un jeune plant ayant atteint au niveau de la graine, un stade de développement assez avancé.

Les graines du premier lot (L₁) ont été préalablement débarrassées de leur deux téguments (testa et tegmen) ; celles du deuxième lot (L₂) ont été privées seulement de leur tégument externe (testa) alors que celles des troisième et quatrième lots (L₃ et L₄) sont constituées par des semences intactes.

Les trois premiers lots (L₁, L₂ et L₃) ont été ensemencés dans des tubes de verre à raison d'une graine par tube de culture contenant un substrat nutritif ; milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) pour les macro-éléments et vitamines, additionné des oligo-éléments de HELLER (1953), de Fe EDTA (5 ml par litre de milieu d'une solution obtenue en dissolvant 7,45 g de Na₂ EDTA et 5,57 g de Fe SO₄. 7H₂O dans un litre d'eau distillée) ; de 20 g de saccharose et de 7,5 g de Bacto agar Difco pour un litre d'eau distillée. Le pH a été ajusté à 5,7 avant autoclavage (15 mn à 120°C).

Le quatrième lot (L₄) a été ensemencé dans des giffypots, à raison d'une graine par pot, remplis de terre provenant du verger où se développent les pieds-mères.

Toutes les cultures ont été placées dans une pièce climatisée à 29°C ± 1 avec un éclairage artificiel de 3.000 lux à proximité des cultures pendant 16 heures par jour. Nous avons noté pour chaque lot le nombre de graines germées en fonction du temps.

L'ensemble des résultats est représenté par l'histogramme de la figure 2 et le tableau 1.

Ainsi l'élimination du tégument externe du lot (L₂) a permis de réduire le temps moyen de germination des graines d'au moins une semaine par rapport au temps moyen relatif aux graines non décortiquées (L₃). Mais c'est surtout l'élimination des deux téguments (L₁) qui a remarquablement hâté cette germination. En effet, il a suffi de cinq jours seulement pour que 75 p. 100 des graines décortiquées (L₁) germent, alors que pour atteindre le même taux, il a fallu environ vingt-sept jours pour les graines non décortiquées du lot L₃ et environ trente-cinq jours pour les graines ensemencées en terre du lot L₄ (figure 3).

Les téguments apparaissent donc comme étant responsables du retard de germination ; bien que perméables à l'eau, ils ne seraient pas suffisamment perméables à l'oxygène. En effet, plusieurs auteurs (BLACK et WARRING, 1959 ;

WELLINGTON et DURHAM, 1961 ; COME et TISSAOUI, 1967) ont montré pour d'autres végétaux que les embryons dénudés germent souvent dans des atmosphères pauvres en oxygène et que la scarification des enveloppes, favorisant la pénétration de l'oxygène, active aussi la germination.

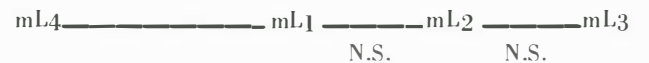
Plusieurs hypothèses ont été émises (BLACK, 1956 ; COME, 1967 ; ASCHI-AGOUBI, 1978) pour expliquer l'imperméabilité à l'oxygène des enveloppes séminales :

- la structure même de ces enveloppes peut être mise en cause,
- la présence d'un inhibiteur de germination soluble dans l'eau,
- la présence de composés phénoliques tégumentaires qui créent une barrière chimique au passage de l'oxygène vers l'embryon,
- des expériences en cours nous permettront, peut-être, de dire laquelle ou lesquelles de ces hypothèses sont les plus probables pour expliquer les mécanismes de cette inhibition tégumentaire.

Étude du degré de polyembryonnité.

Quatre lots de 96 graines chacun, ont été mis à germer dans les mêmes conditions que précédemment ; nous avons noté le nombre d'embryons développés (Ni) pour chacune des graines. Les résultats sont portés sur le tableau 2.

Nous avons établi une comparaison de moyennes prises deux à deux d'après le test de STUDENT - FISCHER ; les résultats sont portés sur le schéma ci-dessous où les moyennes sont classées par ordre croissant ; N.S. correspond à une absence de signification entre deux résultats ; entre les autres les différences sont hautement significatives.



Dans les conditions normales, les embryons de petites tailles, sans doute faute de réserves suffisantes et vu la compétition à laquelle ils sont soumis, n'arrivent pas à se développer, alors que *in vitro*, sur milieu nutritif convenable, ils sont capables d'évoluer en jeunes plantes bien que, néanmoins, les phénomènes de toute compétition n'aient pas complètement disparus (figure 4).

Ceci confirme les résultats obtenus par MOREIRA et al.

TABLEAU 1.

numéro du lot	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄
nombre de graines germées	55	59	55	59
moyenne en jours	4,745	12,271	25,273	33,61
variance S ₂	1,935	5,621	7,144	9,187

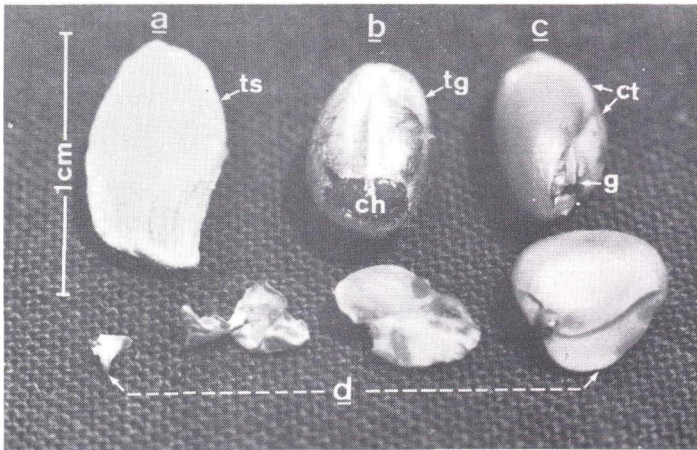


Figure 1 - Morphologie de la graine

- a) graine entière,
 - b) graine sans testa,
 - c) graine sans testa et sans tegmen
 - d) embryons d'une même graine (polyembryonie)
- Symboles : ct = cotylédons, ch = chalaze, g = gemmule, ts = testa, tg = tegmen.

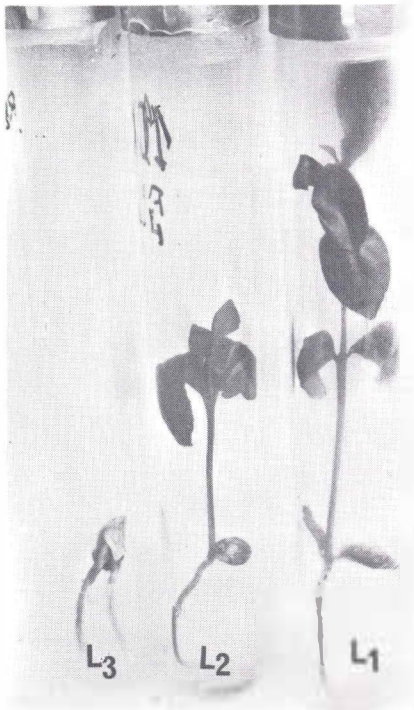


Figure 3 - Plants de vingt-cinq jours issus de germination aseptique.

- L1 - Plant issu de graine sans tégument
- L2 - Plant issu de graine avec un tégument
- L3 - Plant issu de graine avec deux téguments

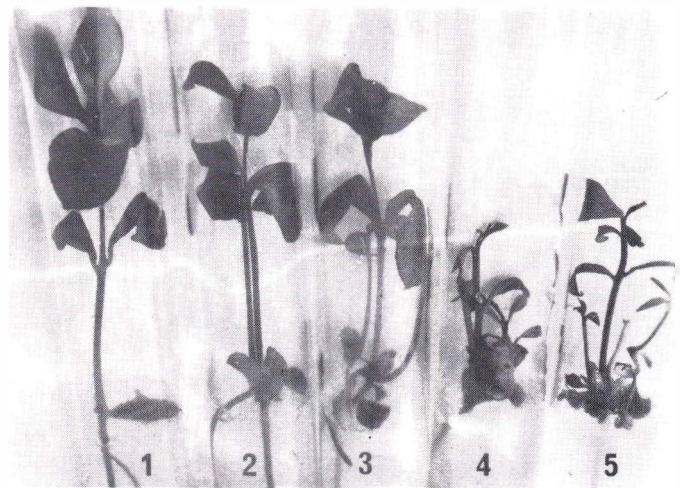
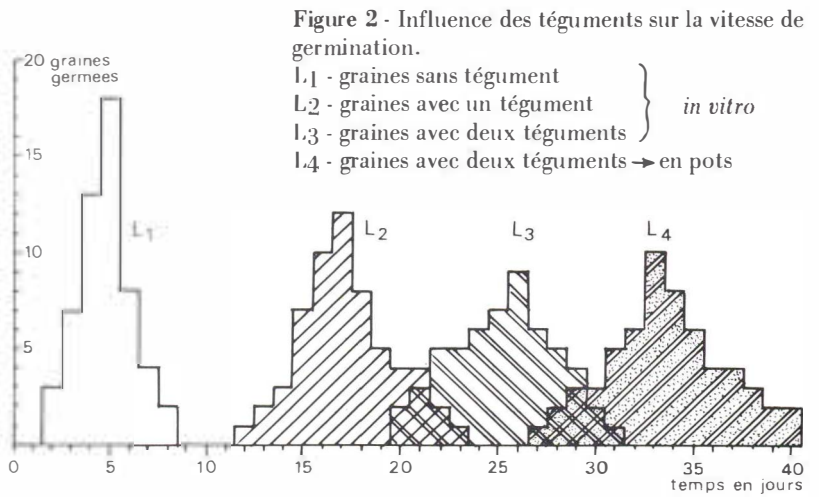


Figure 4 - Germination aseptique et polyembryonie; graines ayant donné de 1 à 5 plants.

(1974) et explique par ailleurs, la différence hautement significative entre le comportement des graines du lot 4 plantées en pots et celui des graines des lots 1, 2 et 3 mises à germer *in vitro* sur milieu artificiel.

La germination de ces embryons est de type hypogée ; les jeunes plantes issues d'une même graine ont des cotylédons présentant une grande variabilité quant à leur forme et leur nombre, certaines plantes sont pourvues d'un seul cotylédon alors que d'autres en ont deux ou trois. Les jeunes plantes manifestent une croissance rapide. Le premier entrenœud est en général bien développé et se termine toujours par deux feuilles opposées et arrondies avec un pétiole ailé et bien développé et sont insérées suivant un indice phyllotaxique aux 3/8.

Les jeunes plantes cultivées *in vitro*, comparées à celles de même âge cultivées en pot, sont de taille plus réduite. De plus, même quand elles atteignent un stade de développement assez avancé, ces plantes n'ont jamais d'épines à l'aisselle de leurs feuilles, alors que celles cultivées dans les conditions normales en présentent à partir de la quatrième ou cinquième aisselle foliaire.

Nous savons par ailleurs qu'en culture *in vitro*, il nous a été possible d'obtenir la formation d'épines sur des axes feuillés provenant du développement de bourgeons latents de noeuds prélevés sur l'arbre (BOUZID, 1973). On peut se demander alors pourquoi cette spinescence ne s'est pas manifestée *in vitro* sur de jeunes plants issus de semis.

Pour répondre à cette question, il est bon de mentionner au préalable, certaines des conditions émises par L. BANCILHON, 1969, dans son étude expérimentale d'un groupe de *Phyllanthus* (Euphorbiacée) à rameaux dimorphes. Cet auteur a, en effet, mis en évidence que, chez ces végétaux, la différenciation d'un méristème latéral dans le sens plagiotrope est sous la dépendance du méristème de l'axe orthotrope qui joue, vis-à-vis de lui, un rôle organisateur. Elle a

pu montrer aussi, que ce méristème terminal de l'axe orthotrope évolue au cours du développement à partir de la graine et que cette évolution se traduit en particulier dans ses capacités organisatrices. Il est d'abord non inducteur (d'où l'absence de ramification plagiotrope durant les premiers stades suivant la germination), puis acquiert progressivement son rôle organisateur qui ne se fait pleinement sentir qu'après un certain temps de croissance du végétal. Ce rôle organisateur du méristème terminal et l'acquisition progressive de ses capacités organisatrices sont des faits qui, à notre avis, dépassent largement le cadre des *Phyllanthus* et qui, par conséquent, pourraient se retrouver chez les jeunes plantes de *Citrus*. Nous pensons, en effet, que chez ces derniers, le méristème terminal posséderait la propriété d'orienter en épine le développement de jeunes méristèmes latéraux et que ce rôle ne serait pleinement acquis qu'au bout d'un certain temps de fonctionnement, ce qui permettrait de comprendre que dans les conditions normales il n'y ait pas d'épines au niveau des trois ou quatre premières aisselles foliaires.

Par ailleurs, nous pensons que le fonctionnement du méristème terminal peut être fortement modifié, sous l'influence de facteurs externes, et tout particulièrement au cours des premières étapes de développement quand il ne possède pas encore l'ensemble de ses propriétés organisatrices. Ceci expliquerait qu'à ces jeunes stades, le méristème apical caulinaire, dans certaines conditions de milieu (culture *in vitro*), ne soit pas capable d'induire la formation d'épines.

Ainsi toutes ces plantes issues de semis paraissent suivre le même processus de croissance et de développement. Cependant cette homogénéité dans le fonctionnement n'est qu'apparente. A une première variabilité d'ordre génétique entre embryons sexués et nucellaires et donc due à l'origine même de ces plantes, s'ajoute un polymorphisme de fonctionnement des individus obtenus à partir des embryons nucellaires de la même plante (LASRAM, 1975). Ceux-ci, bien que

TABLEAU 2 - Nombre d'embryons par graine germée des différents lots.

nombre d'embryons développés (Ni) par graine	nombre de graines germées			
	L1	L2	L3	L4
1	36	24	19	57
2	31	41	35	4
3	20	17	18	1
4	6	8	18	1
5	2	4	4	0
6	1	2	2	0
total des graines germées	96	96	96	63
nombre moyen d'embryons par graine	2,063	2,302	2,573	1,143
variances S ²	1,184	1,377	1,516	0,249

pourvus du même potentiel héréditaire, ne sont pas identiques entre eux, ils se caractérisent tous, en outre, par une rusticité et une vigueur nettement supérieures à celles des «vieux clones».

CONCLUSION

Ainsi l'ensemencement des graines de Citrus, en condition aseptique sur milieu nutritif gélosé, nous a permis de mettre en évidence le rôle inhibiteur des téguments sur la germination. L'élimination de ces téguments, avant l'ensemencement, a réduit le «délai de germination». De plus, cette méthode de culture a rendu possible le développement de l'ensemble

des embryons d'une même graine, même ceux de petite taille, ce qui nous a permis d'étudier, avec plus de précision, le degré de polyembryonie de ces graines. Le développement de ces graines en jeunes plantes nous a également permis de suivre quelques aspects de la morphogénèse de ces dernières durant les premiers stades de l'ontogénèse du végétal.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M. le Professeur R. NOZERAN (Faculté des Sciences d'Orsay-France) ainsi que M. le Professeur N. CHALBI (Faculté des Sciences de Tunis).

BIBLIOGRAPHIE

- ASCHI-AGOUBI (S.). 1978.
Contribution à l'étude physiologique de la germination de l'alfa (*Stipa tenacissima* L.).
D.E.A. de Physio. et Bio. Fac. Sc. Tunis.
- BANCILHON (L.). 1969.
Etude expérimentale de la morphogénèse végétative et de la floraison d'un groupe de *Phyllanthus* (Euphorbiacées).
Thèse de Doctorat, Univ. Paris-Sud.
- BLACK (M.). 1956.
Interrelationships of germination inhibitors and oxygen in the dormancy of seed of *Betula*.
Nature, 178 : 924-925.
- BLACK (M.) et WAREING (P.F.). 1959.
The role of germination inhibitors and oxygen in the dormancy of light sensitive seed of *Betula* spp.
J. Exp. Bot., 10 : 134-145.
- BOUZID (S.). 1973.
Utilisation des cultures *in vitro* pour la solution de problèmes posés par l'amélioration des agrumes (en particulier multiplication végétative).
Thèse Doctorat 3e cycle, Fac. Sc. Tunis, 78 p.
- CÔME (D.). 1967.
L'inhibition de germination des graines de pommiers (*Pirus malus* L.) non dormantes. Rôle possible des phénols tégumentaires.
Ann. Sc. Nat. Bot., VIII : 371-478.
- CÔME (D.) et TISSAOUI (T.). 1967.
Induction d'une dormance embryonnaire secondaire chez le pommier (*Pirus malus* L.) par des atmosphères très appauvries en oxygène.
C.R. Acad. Sc., 266 : 477-479.
- HELLER (R.). 1953.
Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*.
Ann. Sc. Nat. Bot., IIème série, vol. 14 : 1-223.
- LASRAM (M.). 1975.
Premières réflexions à propos du polymorphisme des arbres issus d'embryons nucellaires chez l'orange Maltaise demi-sanguine de Tunisie.
C.R. Acad. Sc., Paris, 281, D : 795-798.
- MOREIRA (S.), GURGEL (J.T.A.) et ARRUDA (L.F.). 1947.
Poliembrionia em Citrus.
Bragantia, 7 : 69-106.
- MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.). 1962.
Arevised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15 : 463-497.
- WELLINGTON (P.S.) et DURHAM (V.M.). 1961.
Studies on the germination of wheat grains during maturation.
Ann. Bot. G.B., 25, 98 : 185-196.

