

La régénération des agrumes en Corse par la technique du microgreffage des méristèmes «*in vitro*».

Maryse NICOLI*

LA REGENERATION DES AGRUMES EN CORSE
PAR LA TECHNIQUE DU MICROGREFFAGE DES
MERISTEMES «*IN VITRO*».

Maryse NICOLI.

Fruits, Fev. 1985, vol. 40, n° 2, p. 113-136

RESUME - La régénération des variétés d'agrumes par la technique de microgreffage de méristèmes *in vitro* a été mise au point par NAVARRO en 1975. Cette technique a été appliquée en Corse depuis 1978 dans le cadre du plan d'amélioration sanitaire des variétés d'agrumes entrepris par la Station de Recherches agronomiques INRA-IRFA de San Giuliano.

La technique initiale ne donnant pas les résultats escomptés dans les conditions locales, un certain nombre d'améliorations décrites dans ce texte ont été apportées. Elles portent d'une part sur les conditions d'obtention des jeunes pousses sur lesquelles seront prélevés les méristèmes, de ces conditions dépendent notamment les pourcentages de contamination par les maladies à virus des plants obtenus. D'autre part l'adoption du second greffage a permis de supprimer la perte importante de plants que l'on avait lors du passage des plants régénérés du milieu de culture liquide à la terre. L'ensemble de ces améliorations a fait notablement augmenter le pourcentage de réussite du microgreffage.

Enfin certaines lignées très contaminées ont dû subir un passage en thermothérapie pour être débarrassées des maladies à virus qu'elles renfermaient.

INTRODUCTION

Sur une production mondiale de fruits, toutes espèces réunies, d'environ 300 millions de tonnes, les agrumes avec 56 millions de tonnes (19 p. 100) occupent la seconde place après les raisins de table et de cuve (24 p. 100) et devancent les bananes (13 p. 100) et les pommes (12 p. 100) (CASSIN, 1982).

Les agrumes sont originaires des régions tropicales ou

subtropicales du sud-est asiatique, mais ce sont les pays situés entre les 20ème et 40ème parallèles nord et sud qui fournissent environ 80 p. 100 de la production mondiale.

Les principaux producteurs sont la Floride (environ 10 millions de tonnes), le Brésil (9 millions de tonnes), le Japon (3,6 millions de tonnes), l'Espagne (près de 3 millions de tonnes), etc. Le bassin méditerranéen fournit autant d'agrumes que les Etats-Unis, soit environ 24 p. 100 de la production mondiale. Dans cette zone, l'Espagne est suivie par l'Italie, Israël, l'Egypte, le Maroc, la Turquie, etc. (CASSIN, 1982).

* - Station de Recherches agronomiques INRA-IRFA - San Giuliano, 20230 SAN NICOLAO (Corse).

Les conditions climatiques qui règnent sur la majeure partie de la France continentale ne permettent pas aux agrumes de prendre une grande extension. La Côte d'Azur possède quelques plantations de bigaradiers à fleurs (région de Vallauris), de citronniers (région de Menton) et quelques parcelles de clémentiniers, mandariniers et orangers. Quelques petites plantations d'agrumes existent également sur le littoral des Pyrénées orientales (BLONDEL, 1970).

Depuis plusieurs siècles la Corse se livre à la culture des agrumes. A la fin du siècle dernier ce département produisait annuellement plusieurs milliers de tonnes de cédrats qui étaient transformés en fruits confits et expédiés dans de nombreux pays d'Europe. Cette agrumiculture a décliné sous l'influence de nombreux facteurs et en 1957 on ne comptait plus que 200 à 300 hectares consacrés dans l'île à cette culture.

La remise en valeur de la Corse qui a débuté à cette date a permis de donner un nouvel essor à l'agrumiculture. Actuellement on admet que les agrumes occupent environ 2.400 hectares, la plus grande partie de cette surface étant concentrée sur la plaine orientale de l'île. Pour des raisons économiques, c'est le clémentinier qui est l'espèce la plus cultivée (environ 2 200 ha). Au cours de la campagne 1983-1984, 30 000 tonnes de clémentines ont été récoltées représentant une valeur d'environ 50 millions de francs mais ne couvrant que 10 p. 100 des besoins du marché français. Les agrumes occupent la deuxième place des productions végétales de la Corse, derrière la vigne.

Les premières plantations d'agrumes qui ont été établies dans l'île à partir de 1958-1959 ont été effectuées avec les quelques plants disponibles sur place mais surtout avec des plants importés d'Algérie et du Maroc. Dans les deux cas, il s'agissait de clémentiniers, mandariniers et orangers greffés sur bigaradier dont l'état sanitaire était inconnu. L'utilisation du bigaradier comme porte-greffe telle qu'elle était pratiquée à l'époque en Afrique du Nord représentait un danger important pour la jeune agrumiculture corse. En effet, en 1957, les premières manifestations de Tristeza étaient apparues en Espagne. Cette maladie à virus qui avait détruit des millions d'agrumes en Amérique du sud risquait d'envahir tout le bassin méditerranéen. Or on savait déjà d'une part que la Tristeza entraînait la mort de toutes les variétés (excepté le citronnier) greffées sur bigaradier, et d'autre part que les autres porte-greffe d'agrumes étaient sensibles à d'autres maladies à virus et ne pouvaient être utilisés qu'avec des variétés indemnes de ces maladies.

C'est pourquoi un des premiers objectifs assigné à la Station de Recherches agronomiques de San Giuliano, créée en 1958, a été d'améliorer l'état sanitaire des variétés d'agrumes afin de pouvoir employer des porte-greffe constituant avec ces variétés des associations à la fois tolérantes à la Tristeza et indemnes des maladies à virus auxquelles ces nouveaux porte-greffe étaient sensibles. Cette amélioration sanitaire a fait appel aux deux techniques connues à l'époque, c'est-à-dire l'indexation sur plantes indicatrices et la sélection de plants d'origine nucellaire.

Grâce à l'indexation sur plantes indicatrices, des lignées de clémentiniers indemnes des principales maladies à virus connues ont pu être mises à la disposition des pépiniéristes de Corse à partir de 1965. Des sélections de plus en plus performantes et dont l'état sanitaire était meilleur d'année en année ont été effectuées grâce, en particulier, à la découverte de nouvelles plantes indicatrices et à l'amélioration de leurs conditions de culture.

TABLEAU 1 - Principales espèces d'agrumes cultivées.

● Famille des Rutaceae.

(Classification d'après J.B. CARPENTER et P.C. REECE)

Sous-famille des Aurantioideae

Tribu des Citrae

Sous-tribu des Citrinae.

- Genres

Poncirus	<i>P. trifoliata</i> (L.). RAF.
Fortunella	Kumquat
Citrus	
<i>C. medica</i> L.	Cédratier
<i>C. limon</i> (L.) BURN.	Citronnier
<i>C. aurantifolia</i> (CHR.) SWING	Limettier vrai
<i>C. latifolia</i> TAN.	Limettier à gros fruits
<i>C. limonia</i> OSB.	Lime mandarine
<i>C. limetta</i> RISSO	Limette
<i>C. limettioides</i> TAN.	Limettier doux
<i>C. aurantium</i> L.	Bigaradier
<i>C. myrtifolia</i> RAF.	Chinois
<i>C. bergamia</i> RISSO et POIT.	Bergamotier
<i>C. sinensis</i> (L.) OSB.	Oranger
<i>C. unshiu</i> (MAK.) MARC.	Mandarinier Satsuma
<i>C. nobilis</i> LOUR.	Mandarinier à gros fruits
<i>C. deliciosa</i> TEN.	Mandarinier commun
<i>C. reticulata</i> BLANCO	Mandariniers autres dont clémentinier
<i>C. grandis</i> (L.) OSB.	Pamplemoussier
<i>C. paradisi</i> MACF.	Pomelo

- Principaux hybrides cultivés :

Citrage : oranger X *Poncirus trifoliata*

Tangelo : pomelo X mandarinier.

Pour les espèces d'agrumes autres que le clémentinier, des introductions de sélections américaines et l'obtention de plants d'origine nucellaire ont permis d'obtenir des plants indemnes de la plupart des variétés commerciales. Ces variétés qui ne présentent souvent pas beaucoup d'intérêt pour la Corse, sont cependant nécessaires pour la fourniture des greffons aux pays avec lesquels la France a signé des contrats d'assistance technique et que seule la Corse peut fournir en ce qui concerne les agrumes. Dans le tableau 1 sont mentionnées les principales espèces d'agrumes cultivées. C'est parmi ces espèces que les meilleures variétés ont été choisies et font l'objet du plan de régéné-

ration entrepris par la Station de Recherches agronomiques de San Giuliano.

SELECTION SANITAIRE DES AGRUMES

Les agrumes, comme la plupart des espèces fruitières, sont attaqués par de nombreuses maladies. Parmi celles-ci, ce sont les maladies transmissibles dues à des virus, des viroïdes ou des mycoplasmes qui occasionnent les dégâts les plus importants. Ces maladies, quand elles n'entraînent pas la mort des arbres, provoquent toujours une diminution de la production et un ralentissement de la végétation et parfois une mauvaise qualité des fruits.

Pour toutes ces maladies il est pratiquement impossible de détruire l'agent causal à l'intérieur de l'arbre en plein champ sans tuer l'arbre lui même. Il en est presque de même pour certaines maladies cryptogamiques comme le Mal Secco contre lesquelles la lutte chimique est extrêmement difficile.

Afin d'éviter ces risques et améliorer la rentabilité de la culture des agrumes, il est nécessaire d'obtenir des lignées exemptes de ces maladies. La Station de Recherches agronomiques de Corse a entrepris depuis plus de 20 ans la sélection sanitaire des variétés d'agrumes.

Parmi les techniques employées, la régénération par microgreffage de méristèmes «*in vitro*» est actuellement la plus utilisée.

But et définition des termes.

Le méristème caulinaire est une partie de la plante qui est en général peu contaminée par les agents pathogènes. Dans la pratique, le méristème caulinaire est constitué par le dôme apical plus une ou deux ébauches foliaires alors que l'apex désigne l'ensemble formé par le méristème et des tissus sous-jacents sans préjuger des dimensions (MARGARA, 1982).

Chez les agrumes les méristèmes placés sur un milieu nutritif refusent de s'enraciner, ce qui rend pratiquement irréalisable leur culture «*in vitro*». C'est pourquoi la régénération des variétés malades doit faire appel à une autre technique : celle du microgreffage de méristèmes «*in vitro*».

Principales maladies pouvant être éliminées par le microgreffage de méristèmes.

Il s'agit des maladies transmissibles (à virus, à viroïdes, à mycoplasmes) et d'une maladie cryptogamique : le Mal Secco. Pour toutes ces maladies, l'expérience a montré que le pourcentage de contamination des méristèmes est relativement faible, ce qui permet de les éliminer par la technique de microgreffage de méristèmes.

Nous ne mentionnerons ici que les maladies présentes en France et ne donnerons qu'un bref aperçu des dégâts qu'elles occasionnent.

● Les maladies à virus.

Pour certaines maladies : Frisolée-Panachure infectieuse, Léprose et Tristeza, les virus responsables ont été observés au microscope électronique et caractérisés. Pour toutes les autres maladies «à virus» des agrumes, l'agent causal n'a jamais été observé. C'est le comportement de ces agents et en particulier leur transmissibilité qui permet de supposer qu'ils ont une origine virale.

- La Cachexie-Xyloporose.

On considère que cette maladie décrite dans deux pays éloignés (Palestine et Floride) et sous deux noms différents est causée par un même agent infectieux non encore observé au microscope électronique. Les clémentiniers, limettiers doux, limettier Rangpur, mandariniers et certains tangelos, sont sensibles à cette maladie alors que les orangers, pomelos, bigaradiers, citronniers, sont tolérants. Sur tangelo Orlando, la Cachexie-Xyloporose provoque un certain nanisme des plants, le jaunissement et la chute des feuilles et, si la souche est sévère, elle peut entraîner la mort des arbres.

Cette maladie n'est transmissible ni par la graine (CHILDS et al, 1965 ; OLSON, 1965) ni par insectes vecteurs (NORMAN et CHILDS, 1963).

En Corse la maladie a été décelée sur mandariniers communs, clémentiniers, orangers et citronniers.

- La Tristeza.

D'une part c'est une maladie d'association qui interdit l'utilisation du bigaradier comme porte-greffe puisqu'elle entraîne la mort de toutes les espèces, excepté le citronnier, greffées sur bigaradier. D'autre part sur les espèces sensibles tels que limettiers, pomelos, *Citrus macrophylla*, etc. elle induit des symptômes de «Vein Clearing» (décoloration des nervures des feuilles) et de «Stem pitting» (trous dans le bois) que celles-ci soient greffées ou non. Un nanisme plus ou moins marqué selon la virulence de la souche est observé et la production est affectée.

Les particules virales sont flexueuses, d'environ 10 X 2 000 nm (KITAJIMA et al, 1964). Elles sont transmises par plusieurs espèces de pucerons mais non par la graine.

. Maladies induisant des symptômes foliaires dits «de Psorose».

Plusieurs maladies : le Cristacortis, le Concave Gum-Blind Pocket, la Frisolée-Panachure infectieuse et la Psorose écailleuse, induisent des symptômes foliaires identiques sur les agrumes (photo 1). Ces symptômes se présentent

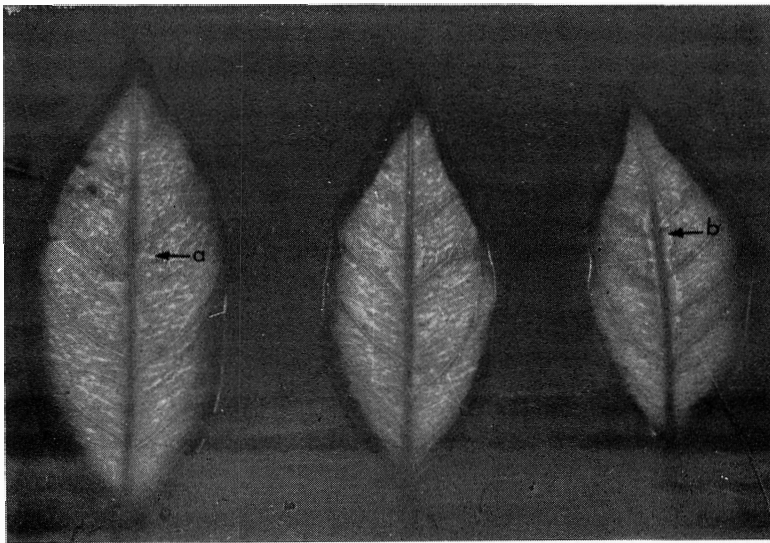


Photo 1. Symptômes foliaires de Psorose.

a : décoloration en tirets.

b : décoloration en «feuille de chêne».

soit sous forme de décoloration en «tirets» entre les nervures secondaires des jeunes feuilles, soit sous forme d'une décoloration irrégulière mais continue, de part et d'autre de la nervure centrale, appelée «feuille de chêne». Ces deux symptômes peuvent apparaître ensemble sur une même feuille.

Nous n'avons regroupé ces diverses maladies, qui n'ont aucun autre lien entre elles, que pour montrer que le seul fait d'observer un de ces deux symptômes foliaires sur un arbre permet de conclure que celui-ci est malade bien avant que les symptômes corticaux n'apparaissent.

Les manifestations de cette maladie ont été décrites pour la première fois en Corse (VOGEL-BOVE, 1964). La plupart des variétés d'agrumes y sont sensibles, sauf les citronniers, bergamotiers, cédratiers, limettiers vrais, et *Poncirus trifoliata* (VOGEL-BOVE, 1969). Le virus n'a pas été observé au microscope électronique. Il ne semble se transmettre ni par la graine, ni par vecteur animal, ni mécaniquement par les outils. Le Cristacortis induit des symptômes foliaires dits de «Psorose» (VOGEL-BOVE, 1972) et un «Stem pitting» sur les troncs, branches et rameaux. Cette maladie affecte de très nombreux agrumes cultivés en Corse.

L'agent causal n'a pas été observé au microscope électronique. Ses manifestations apparaissent sur plusieurs variétés mais les orangers et mandariniers sont les plus sensibles. Au contraire le bigaradier est tolérant : il ne manifeste pas de symptômes. Le Concave-Gum - Blind Pocket induit des déformations du bois sur les troncs, les branches et les rameaux et des symptômes foliaires dits «de Psorose».

En Corse les arbres contaminés par la maladie présentent un nanisme important et leur production peut être réduite de plus de 50 p. 100 (VOGEL, 1978).

Cette maladie provoque des déformations plus ou moins accusées sur les feuilles adultes, entraîne une réduction de la croissance des arbres et une chute importante de la production. Le virus a été observé au microscope électronique. Il est transmis mécaniquement et par la graine mais non par vecteur animal.

En Corse c'est sur mandarinier Cléopâtre que l'on a noté les symptômes foliaires les plus marqués. (VOGEL et BOVE, 1977).

Les orangers, mandariniers, pome-
los, sont des espèces sensibles à
cette maladie. En plus des symptô-
mes foliaires, elle se manifeste par un écaillage plus ou
moins important de l'écorce du tronc ou des branches.

L'écaillage est favorisé par la température c'est pourquoi les manifestations sont en général moins sévères en Corse que dans les pays plus chauds. La maladie peut quelquefois être transmise par la graine (BRIDGES et al, 1965 ; PUJOL, 1966) et peut-être par insectes vecteurs. On peut l'inoculer mécaniquement. Le virus n'a pas été observé au microscope électronique.

- Une maladie à viroïdes : l'Exocortis.

Contrairement aux virus dont l'acide nucléique est entouré par une capsidie protéique, les viroïdes ne possèdent pas de capsidie et leur acide nucléique est libre.

L'Exocortis provoque des symptômes sur certaines espèces sensibles : *Poncirus trifoliata*, certains citranges, limettier Rangpur, limettiers doux, cédratiers. Au contraire les orangers, mandariniers, pomelos, sont tolérants à l'Exocortis. Sur les espèces sensibles utilisées comme porte-greffe l'Exocortis induit des symptômes d'écaillage de l'écorce et un nanisme des plants infectés. Sur les variétés sensibles (cédratier par exemple) on note l'épinastie et l'enroulement des feuilles. Le viroïde a été observé au microscope électronique, il est transmissible par les outils, mais ne semble pas être transmis ni par la graine ni par vecteur animal.

● Une maladie à mycoplasmes : le Stubborn.

On a longtemps considéré le Stubborn comme une maladie à virus. Les observations au microscope électronique ont permis de démontrer qu'un microorganisme procaryote : *Spiroplasma citri* était l'agent causal de cette maladie. Ce microorganisme a été cultivé «*in vitro*» (SAGLIO et al, 1971). La maladie ne semble pas être transmissible ni par la graine ni mécaniquement. Les cicadelles sont responsables de sa propagation en plein champ. Le Stubborn induit des symptômes foliaires se traduisant par une réduction de la taille des feuilles et l'apparition de décolorations entre les nervures secondaires, des entre-noeuds courts, une végétation ralentie et la déformation des fruits en «glands». Dans les cas les plus sévères les arbres atteints deviennent totalement improductifs. Ce sont les orangers qui sont les plus sensibles mais la maladie peut affecter les autres espèces d'agrumes. *Spiroplasma citri* se multiplie activement à 32°C et c'est à cette température que les symptômes sont les plus typiques et les plus accusés. Dans les pays où cette température est rarement atteinte, comme en Corse, les manifestations du Stubborn sont plus bénignes.

● Une maladie cryptogamique : le Mal Secco.

Le Mal Secco est une maladie cryptogamique due à un champignon : *Deuterophoma tracheiphila* PETRI. Cette maladie constitue un grave danger pour les vergers de citronniers, cette espèce étant la plus sensible. D'autres espèces d'agrumes peuvent être attaquées (orangers, clémentiniers, *Poncirus trifoliata*, etc.) mais les dégâts sont moins sévères. Sur citronnier la contamination par le champignon peut s'effectuer soit par le sol, auquel cas il provoque une apoplexie et la mort rapide de l'arbre, soit par les blessures foliaires causées en particulier par le vent. Dans ce cas on note une chlorose des feuilles et un dessèchement progressif des rameaux et des branches à partir des extrémités. Le champignon évolue dans les faisceaux du bois où il est extrêmement difficile à détruire.

Cette maladie qui épargne encore la Corse a détruit un grand nombre de citronniers de la Côte d'Azur.

Les techniques d'amélioration sanitaire des agrumes (description succincte).

Comme nous l'avons déjà indiqué, les maladies à virus des agrumes ont une action dépressive sur la productivité, le comportement des arbres en verger et parfois sur la qualité des fruits. C'est pourquoi la sélection sanitaire des lignées d'agrumes est devenue au cours des dernières décennies le facteur le plus important de l'amélioration de la rentabilité des agrumes.

Les techniques d'amélioration sanitaire des agrumes font appel à la fois à des techniques de détection des maladies et à des techniques de création de lignées saines. Nous donnerons ci-après une description succincte de ces diverses techniques.

● Les techniques de détection des maladies.

Les variétés ou les espèces d'agrumes sensibles à telle ou telle maladie présentent des symptômes en plein champ et leur état sanitaire peut donc être connu à la suite d'un simple examen visuel.

Au contraire, de nombreuses autres variétés ou espèces peuvent être contaminées par une ou plusieurs maladies sans manifester le moindre symptôme. Ce sont des variétés ou espèces tolérantes. Pour celles-ci l'état sanitaire ne pourra être connu qu'après la mise en oeuvre de techniques de détection des maladies.

Plusieurs techniques de détection sont utilisées.

- L'indexation sur plantes indicatrices.

L'indexation permet de contrôler l'état sanitaire des arbres. Pour cela des plantes très sensibles aux diverses maladies transmissibles, appelées plantes indicatrices, sont greffées avec des écussons d'écorce ou des morceaux de feuilles des arbres à tester puis placées dans les meilleures conditions de température pour favoriser l'expression des symptômes des maladies à détecter. Les plantes indicatrices pour la Cachexie-Xyloporose, l'Exocortis et le Stubborn sont cultivées sous serre chauffée à 32°C alors que les autres plantes indicatrices sont gardées à température ambiante. Après un temps plus ou moins long les plantes indicatrices qui n'ont pas manifesté de symptômes sont considérées saines et par conséquent les arbres testés indemnes de la maladie recherchée. Actuellement 6 plantes indicatrices différentes sont utilisées en Corse : limettier mexicain pour la Tristeza, cédratier Etrog pour l'Exocortis, mandarinier Parson Spécial pour la Cachexie-Xyloporose, orangers Hamlin ou Pineapple pour les maladies induisant des symptômes foliaires de Psorose, tangelos Orlando ou William's pour le Cristacortis et oranger Madame Vinous pour le Stubborn. L'indexation de toutes les maladies transmissibles demande environ 2 ans (VOGEL, 1973 ; VOGEL et BOVE, 1976).

- La mise en culture de *Spiroplasma citri*.

SAGLIO et al (1971), les premiers ont cultivé «*in vitro*» des microorganismes issus des agrumes. C'est à partir de cultures pures de ces microorganismes que BOVE et SAGLIO (1974) ont déterminé *Spiroplasma citri* agent causal du Stubborn.

Depuis cette date des milieux de culture spécifiques des spiroplasmes ont été mis au point. Des échantillons végétaux (jeunes feuilles, columelle des fruits, etc.) ou des vecteurs potentiels (cicadelles) sont broyés dans ces milieux, filtrés pour éviter les contaminations par les bactéries et mis en culture à 32°C dans ces mêmes milieux. Le développement des colonies de spiroplasmes entraîne une modification du pH du milieu qui vire du rose au jaune. Un examen au microscope à fond noir permet d'observer les spiroplasmes. La détermination de ces organismes est confiée à un laboratoire spécialisé, celui de M. BOVE à Bordeaux par exemple.

Cette technique a permis d'amener une amélioration importante dans la détection de l'agent causal du Stubborn. Elle est beaucoup plus rapide que l'indexation sur plantes indicatrices (quelques jours contre au minimum 1 an) (VIGNAULT et al, 1980).

- La technique E.L.I.S.A.

Pour les agrumes cette technique est utilisée pour la détection du Stubborn et de la Tristeza, deux maladies dont les agents causaux ont été isolés. Une culture pure de *Spiroplasma citri* ou une préparation purifiée du virus de la Tristeza injectée à un animal permet d'obtenir des anticorps spécifiques qui réagiront contre les antigènes (microorganismes ou virus). Cette technique permet de détecter les deux agents pathogènes en 48 heures et de déceler des souches de virus peu virulentes qui provoquent de faibles réactions des plantes indicatrices.

- La microscopie électronique.

Comme nous l'avons déjà indiqué, seuls quelques virus ont été observés au microscope électronique. Il s'agit des virus de la Tristeza, de la Frisolée-Panachure infectieuse et de la Léprose. Le spiroplasma du Stubborn et le viroïde de l'Exocortis ont également été vus. Pour ces maladies, l'observation d'échantillons végétaux, et éventuellement des broyats d'insectes, au microscope électronique, peut permettre la détection directe de ces agents causaux. Cette technique est rapide mais elle a l'inconvénient de ne pouvoir être employée que par des laboratoires bien équipés.

- Les techniques colorimétriques.

Le test colorimétrique au «Bleu Azur» est un test rapide

qui est utilisé pour la détection de la Tristeza. Le bleu azur colore les A.R.N. Après coloration, les coupes fines pratiquées dans les nervures des feuilles prennent une couleur bleu intense aux endroits où il y a concentration du virus. Une vérification de la contamination par le test E.L.I.S.A. est recommandée.

● Les techniques de création de lignées saines.

Les techniques décrites ci-dessus sont uniquement utilisées pour la détection des maladies. Lorsque le matériel végétal est reconnu malade, il est alors nécessaire de s'adresser à d'autres techniques pour créer des lignées saines. Pour les agrumes ces techniques sont la sélection nucellaire, la thérapie et le microgreffage de méristème «*in vitro*».

- La sélection nucellaire.

Les graines de la plupart des variétés d'agrumes renferment plusieurs embryons ; l'embryon sexué qui provient de la fécondation de l'ovule et les embryons nucellaires issus du bourgeonnement du nucelle ou tissus maternel. Ces graines sont dites polyembryonnées. Le semis de ces graines permet de reproduire fidèlement les variétés intéressantes. La sélection a pour but de séparer les plants issus d'embryons sexués de ceux issus d'embryons nucellaires qui seuls nous intéressent. **La sélection nucellaire donne des plants génétiquement identiques à la plante mère et le plus souvent indemnes des viroses connues.** Les plants ainsi obtenus sont appelés «jeunes lignées». C'est une technique très longue. Il faut en effet 10 à 12 ans pour sélectionner les meilleurs sujets et retenir ceux qui remplaceront les vieilles lignées.

Les plants nucellaires ont l'inconvénient de présenter des caractères juvéniles : port érigé, lenteur de la mise à fruits, présence d'épines. Cependant ces caractères s'atténuent avec le temps.

Le faible pourcentage de transmission possible par la graine de certaines maladies à virus (Frisolée - Panachure infectieuse en particulier) oblige les obtenteurs de plants nucellaires à vérifier l'état sanitaire de ces derniers. Il est également plus prudent de vérifier la conformité pomologique des plants avant de les multiplier, certaines variations ayant été observées sur des variétés.

La sélection nucellaire ne peut s'appliquer qu'aux variétés polyembryonnées. En ce qui concerne les variétés monoembryonnées tels les clémentiniers, certains mandariniers, le bergamotier et le citronnier Meyer, etc. la graine ne renferme pas d'embryons nucellaires et le semis ne reproduit donc pas fidèlement la variété. Pour ces variétés on est donc obligé d'employer les autres techniques de régénération.

- La thermothérapie.

Les essais d'utilisation de la chaleur pour détruire certains virus qui contaminent les agrumes datent de plus de 40 ans (FAWCETT et COCHRAN, 1941) mais c'est GRANT en Floride qui le premier a obtenu par cette technique quelques jeunes plants de *Citrus* indemnes de Tristeza et de Psorose écaillée (GRANT, 1957). Depuis, la thermothérapie est utilisée soit pour traiter les baguettes greffons, dans ce cas les rameaux sont trempés pendant un certain temps dans de l'eau chaude, soit pour tenter de débarrasser des jeunes plants des virus qu'ils renferment. On se sert dans ce cas d'enceintes dans lesquelles une chaleur humide est pulsée autour des plants. Comme nous le verrons par la suite, c'est cette dernière technique qui est employée lorsque la thermothérapie doit être alliée au microgreffage de méristèmes «*in vitro*».

Il faut souligner que pour les agrumes la thermothérapie est pratiquement utilisée pour éliminer la Psorose écaillée et la Tristeza. Les essais entrepris ont montré que le viroïde de l'Exocortis était très résistant à la chaleur et que la thermothérapie était parfaitement inefficace pour éliminer cette maladie. Cette technique n'a également pas permis de supprimer la Cachexie-Xyloporose des plants contaminés (CALAVAN et al., 1972).

- Le microgreffage de méristèmes «*in vitro*».

C'est la technique de création de lignées saines la plus utilisée actuellement. C'est cette technique qui fait l'objet de ce mémoire et qui sera développée dans les chapitres suivants.

LA REGENERATION PAR MICROGREFFAGE DE MERISTEME «*IN VITRO*».

Historique.

Grâce aux observations faites auparavant et principalement celles de LIMASSET et CORNUET (1950), G. MOREL et C. MARTIN (1952), ont démontré que les méristèmes, c'est-à-dire le groupe de cellules de la partie terminale des bourgeons, étaient peu contaminés par les virus. Ils ont mis au point la culture «*in vitro*» de ces méristèmes en les cultivant sur un milieu approprié et ont obtenu des plants indemnes de maladies à virus. Cette technique couramment appliquée pour débarrasser les espèces non ligneuses de leurs virus, s'est révélée inefficace pour les Citrus. En effet, les essais de culture de méristèmes d'agrumes de BOVE à Versailles, vers les années 60, se sont soldés par des échecs. Les méristèmes se sont développés en taille mais n'ont jamais émis de racines.

En 1971, des chercheurs américains mettent au point une technique de greffage de méristèmes sur porte-greffe

de semis «*in vitro*». MURASHIGE et al. (1972) obtiennent les premiers plants issus de greffage de méristèmes.

C'est en 1975 que NAVARRO et al. étudient et améliorent cette méthode qui est maintenant utilisée dans tous les pays agrumicoles pour régénérer les plants de Citrus.

Matériel et méthodes.

La technique consiste à greffer sur des jeunes porte-greffe de semis, donc indemnes de virus, élevés «*in vitro*», des méristèmes caulinaires des arbres virosés à régénérer.

● Matériel.

Toutes les opérations se déroulent dans des conditions d'asepsie très rigoureuses sous une hotte à flux laminaire (photo 2). L'asepsie est une des conditions premières pour une bonne réussite parce que le milieu de MURASHIGE et SKOOG est particulièrement favorable au développement des bactéries et des champignons.

- La verrerie : les tubes de culture, boîtes de Petri, le papier filtre et l'eau distillée, sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant une heure.

- Les outils : les pinces, scalpels, bistouris, porte-lames, porte-aiguilles, ciseaux, sont d'abord lavés à l'alcool à 95° puis au cours de la manipulation sont trempés dans des tubes préalablement stérilisés contenant de l'eau de javel à 20 p. 100, de l'alcool à 95° et de l'eau distillée stérile.

- Les milieux de culture : ils sont stérilisés à l'autoclave à 120° C pendant 20 minutes. Ils sont utilisés dans les 15 jours.

- Les mains de l'opérateur sont désinfectées à l'alcool à 95°.

● Méthodes.

Les citranges Troyer et Carrizo sont utilisés comme porte-greffe, pour leur croissance rapide et le caractère trifolié de leurs feuilles qui permet de distinguer leurs pousses de celles du méristème.

Les graines des porte-greffe sont extraites de fruits murs, lavées à l'eau et séchées à l'air libre et à l'ombre. Après séchage elles sont enrobées d'une poudre de quintonzène à 30 p. 100 de matière active et conservées en chambre froide à 5°C. On doit prévoir une quantité suffisante de graines de façon à couvrir la période séparant deux récoltes.

L'élevage des porte-greffe.

Les graines sont débarrassées de leurs deux téguments,



Photo 2 - Hotte à flux laminaire et matériel nécessaire au microgreffage de méristème d'agrumes «*in vitro*».

Photo 4 - Plant de clémentinier greffé, élevé sous serre chauffée, sur lequel on supprime toutes les feuilles pour favoriser le développement des jeunes pousses.

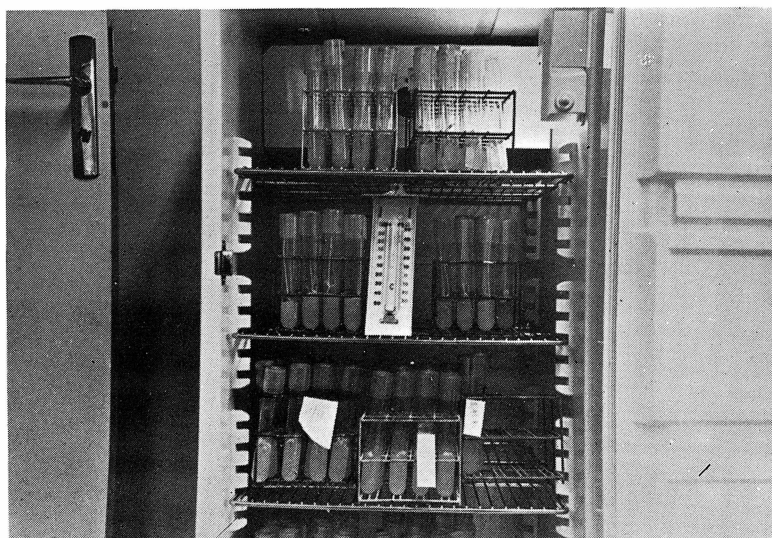
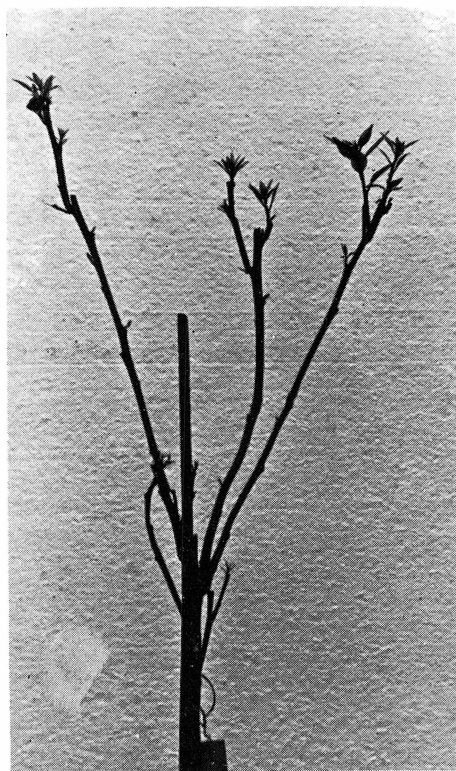


Photo 3 - Incubateur pour la germination des graines et l'élevage des jeunes portegreffe avant greffage.

enveloppées dans de la gaze et désinfectées dans une solution d'eau de javel à 0,7 p. 100 pendant 10 minutes puis rincées trois fois à l'eau stérile. Le milieu de germination est composé des macro et micro éléments de MURASHIGE et SKOOG (1962) (annexe 1), gélosé à 1 p. 100 de Bacto agar et stérilisé à 120° C pendant 20 minutes.

Après refroidissement du milieu de culture, les graines sont déposées sur ce milieu à raison d'une par tube. Les paniers de culture sont ensuite placés dans un incubateur à température constante de 27°C et à l'obscurité totale pendant 15 jours (photo 3). Les chercheurs qui ont mis au point cette technique se sont en effet rendus compte que la reprise au greffage était meilleure lorsque les portegreffe étaient dépourvus de chlorophylle.

Le conditionnement des plants sur lesquels sont prélevés les méristèmes.

Les pieds mères malades sur lesquels sont prélevés les méristèmes sont élevés en serre chauffée. En effeuillant complètement les plants à régénérer on obtient des pousses toute l'année (photo 4).

D'après NAVARRO moins de 10 p. 100 des plants obtenus par microgreffage sont indemnes de symptômes foliaires «dits de Psorose» si les pousses sont prélevées en plein champ alors que 72 p. 100 des plants sont indemnes de ces mêmes symptômes si les pousses sont prélevées dans une serre chauffée entre 27 et 32° C (NAVARRO et al., 1980).

Le greffage «in vitro».

- Préparation des greffons : les jeunes pousses d'environ 3 cm de longueur sont prélevées sur les pieds mères de la serre. Placées dans des sacs en polyéthylène et amenées au laboratoire, elles sont débarrassées de toutes les petites feuilles visibles à l'oeil nu, posées dans la gaze et stérilisées dans une solution d'eau de javel à 0,5 p. 100 pendant 5 minutes. Elles sont ensuite rincées trois fois à l'eau stérile.

- Greffage : les meilleurs pourcentages de reprise au greffage sont obtenus lorsque les porte-greffe ont 15 jours de semis «in vitro». Retirée du tube, posée dans une boîte de Petri avec rondelle de papier filtre humide, la plantule est décapitée à environ 2 cm de l'épicotyle, et la racine est raccourcie à 4 ou 5 cm. Sous la loupe binoculaire, on pratique une coupe en «T» renversé au niveau de l'extrémité épicotylaïre en incisant l'écorce sans léser le bois. On laisse le porte-greffe en attente dans une boîte de Petri et on prélève le greffon.

Toujours sous loupe binoculaire on isole le méristème en lui laissant deux ou trois ébauches foliaires, sa taille ne dépassant pas 0,1 à 0,2 mm. On le prélève à l'aide d'un morceau de lame de rasoir emmanché sur un porte-lame, et on l'insère sous les lèvres de l'incision en prenant bien soin de placer le méristème sur la base du «T» renversé (schéma 1).

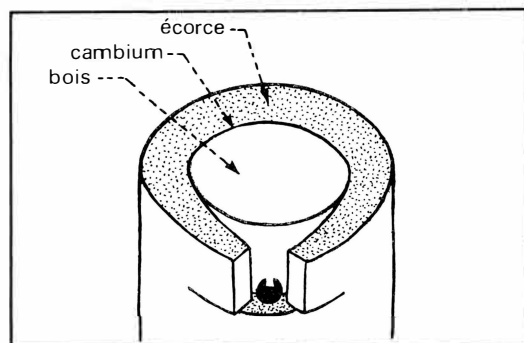


Schéma 1 • MISE EN PLACE DU MERISTEME.

Afin d'éviter la transmission mécanique des virus, le bistouri servant à inciser le porte-greffe n'est pas le même que celui qui sert à prélever le méristème et il est, de plus, désinfecté avant chaque intervention.

- Milieu de culture : le milieu de culture est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes. Les plantules greffées sont placées dans des tubes de culture de 25 mm x 160 mm contenant environ 25 ml de solution de MURASHIGE et SKOOG 1962 (annexe 1) non gélifiée. On a placé dans chaque tube un support de papier filtre perforé qui maintiendra la plantule greffée dans la position verticale. Les tubes sont bouchés avec des bouchons en polypropylène.

- Elevage des plants greffés : les plants greffés sont placés dans une enceinte à température constante de 27°C avec une photopériode de 16 heures et une intensité lumineuse d'environ 5.000 lux. Les cultures sont contrôlées régulièrement sous la loupe binoculaire. On élimine aseptiquement, lorsque cela est nécessaire, les pousses émises par le porte-greffe, à l'aide de longs ciseaux. Le méristème greffé et soudé se développe plus ou moins rapidement suivant les variétés et l'époque de l'année (photo 5).

Le repiquage des plants greffés.

Lorsque la plantule greffée a émis quelques feuilles et que la racine s'est suffisamment développée, ce qui demande à peu près 4 à 5 semaines, on procède au repiquage des plants.

En serre, dans des pots contenant du mélange terreux (2/3 tourbe, 1/3 terre) on repique ces jeunes plants. Les pots sont recouverts par un film plastique pendant 3 semaines à 1 mois afin de maintenir une forte hygrométrie autour de la jeune greffe pour faciliter l'enracinement du porte-greffe. La suppression progressive du film plastique évite les à-coups de végétation. Cependant ce passage du jeune plant du milieu liquide à la terre est délicat et sa croissance est lente les premiers mois. Les plants sont entretenus en serre et arrosés régulièrement avec de la solution nutritive.

La vérification sanitaire.

Comme déjà indiqué auparavant les méristèmes sont la plupart du temps indemnes de maladies transmissibles. Le microgreffage de méristème nécessite le prélèvement de tissus supplémentaires pour permettre la bonne soudure du greffon. L'augmentation de la taille du méristème accroît les risques de sa contamination par les agents pathogènes, et la vérification sanitaire des plants obtenus par cette technique est indispensable avant d'en entreprendre la multiplication. Pour cela on fait appel aux méthodes d'indéxation décrites précédemment.

Certaines maladies : Exocortis, Cachexie-Xyloporose, Stubborn, Tristeza, Frisolée-Panachure infectieuse, sont très faciles à éliminer alors que les maladies induisant des

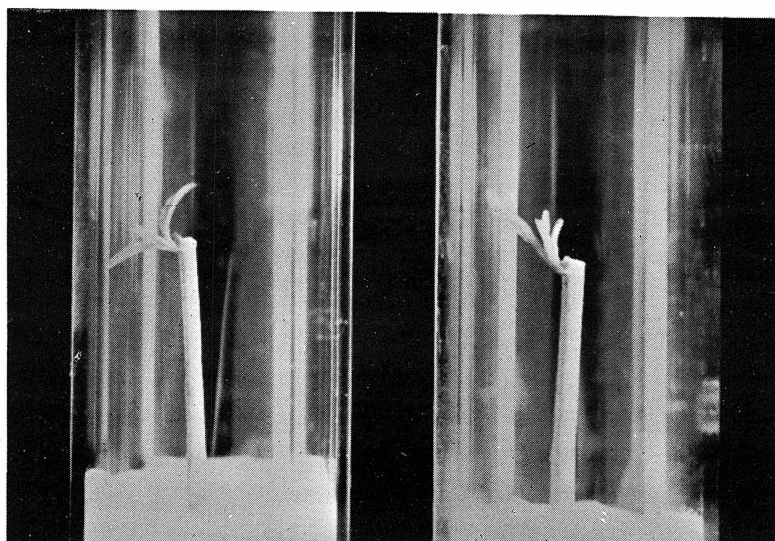


Photo 5 - Développement des méristèmes de clémentinier 20 jours après le microgreffage.

symptômes foliaires «dits de Psorose» posent davantage de problèmes.

Dans le tableau 2 sont donnés les pourcentages de plants sains obtenus par NAVARRO (1981) lorsqu'il prélève les pousses sur les pieds mères élevés à l'extérieur ou sous serre froide.

La vérification pomologique.

Sur les agrumes, l'apparition de mutations est relativement courante. C'est d'ailleurs grâce à elles que sont apparues la plupart des variétés commerciales cultivées actuellement (orangers Washington Navel et Valencia late, pomelo Marsh Seedless, etc.).

Lorsqu'on prélève des jeunes pousses sur un arbre, on n'est donc jamais entièrement sûr que ces pousses ne sont pas récoltées sur une branche en cours de mutation. De plus, des mutations peuvent également apparaître au cours des greffages successifs. C'est pourquoi il est indispensable de vérifier la conformité pomologique des lignées régénérées par microgreffage de méristème.

Contrairement aux plants obtenus par culture de nucelle, technique maintenant abandonnée au bénéfice du microgreffage, les plants régénérés sont en général morphologiquement identiques aux plantes mères et les fruits sont normaux. Ils ne présentent pas non plus de caractères juvéniles (absence d'épines, mise à fruits rapide, parfois apparition des premiers fruits après un an de microgreffage) (NAVARRO, 1979) contrairement aux plants issus de la sélection nucellaire.

TABLEAU 2 - Pourcentage de plants indemnes obtenus par microgreffage • «*in vitro*».

Maladies	% de plants indemnes
Exocortis	98,4
Cachexie-Xyloporose	100
Tristeza	100
Stubborn	100
Frisolée-Panachure infectieuse	100
Psorose	22 *
Concave gum et/ou Impietratura et/ou Cristacortis	12,5 *

• - méristèmes composés de l'apex caulinaire plus 3 ébauches foliaires.

* - Ces % peuvent être respectivement de 85 et 56 lorsque les pousses sont prélevées sur plants malades élevés en serre chaude (27 à 32°C).

La multiplication et la diffusion des lignées régénérées.

Lorsque les tests d'indexation se sont révélés négatifs et que les observations pomologiques sont terminées, les jeunes lignées sont multipliées et plantées en parc à bois. Elles sont ensuite distribuées sous forme de greffons aux pépiniéristes et agrumiculteurs qui en font la demande.

Il faut compter 4 à 5 ans entre la reprise du microgreffage et la distribution des premiers greffons.

Expérimentation menée en Corse.

En Corse, à la Station de San Giuliano, l'application du microgreffage de méristème «*in vitro*» a commencé en 1978.

Les premières années ont été consacrées à la mise au point de la technique sous les conditions de la Corse. Les variétés d'orangers à maturité précoce, Navelina et Salustiana, très contaminées par les maladies transmissibles, ont été utilisées. L'élevage des pieds mères se réalisait sous serre froide. Les jeunes plants issus du microgreffage «*in vitro*» étaient repiqués dans des pots de terre, l'entretien difficile, d'où un pourcentage de reprise faible et la perte d'un grand nombre de jeunes plants. Les quelques plants obtenus ont été indexés, multipliés et plantés en plein champ en 1981.

Depuis le mois de septembre 1981 nous avons intensifié l'application de cette technique. Notre programme a essentiellement porté sur la régénération des lignées de clémentiniers soit à gros fruits soit à maturité précoce d'origine corse ou étrangère.

A la suite de la parution de textes communautaires européens prévoyant la reconversion de l'ancien verger agrumicole corse avant le 31 décembre 1986, une réunion du Syndicat des Producteurs d'Agrumes de Fruits Exotiques de Corse (SPAFEC), du Comité Economique Agricole des Fruits et Légumes (CEAFL), des pépiniéristes et des chercheurs de la Station de San Giuliano, a permis de préciser que les nouvelles lignées de clémentiniers régénérés seront utilisées pour cette reconversion du verger agrumicole corse (NICOLI, VOGEL et CASSIN, 1982).

Nous nous sommes rapidement aperçu que le maintien sous serre froide des pieds mères sur lesquels étaient prélevées les pousses nous donnait un pourcentage très important de jeunes plants manifestant des symptômes foliaires «de Psorose». Cette observation confirmait celles effectuées par NAVARRO (NAVARRO et al., 1980). C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons rentré les pieds mères sous serre chauffée à 27-32° C.

L'élevage des pieds mères sous serre chaude a rapidement posés quelques problèmes dus en particulier à :

- la difficulté de maintenir une température suffisante en hiver (économie d'énergie),
- la place occupée par les pieds mères dans la serre,
- la difficulté d'obtenir des jeunes pousses à certaines périodes de l'année,
- le pourcentage encore très élevé de plants obtenus présentant des symptômes foliaires «dits de Psorose».

Pour éviter tous ces inconvénients nous avons essayé le bouturage.

Le bouturage des pieds mères.

Pour obtenir des jeunes pousses NAVARRO conseillait d'effeuiller régulièrement et complètement les pieds mères. Il fallait attendre environ 20 jours avant qu'on puisse prélever des pousses bonnes à greffer sur ces plants effeuillés. L'expérience a montré, que dans les conditions de notre

serre, les pieds mères refusaient d'émettre des pousses à certaines périodes de l'année, bien que la température maintenue dans la serre soit toujours suffisante pour permettre la croissance des agrumes.

Pour éviter cet inconvénient et ceux énoncés précédemment, nous avons essayé de bouturer, au lieu de les greffer, les pieds mères à régénérer. Le but recherché est l'obtention régulière et en quantité suffisante de jeunes pousses et non pas l'enracinement des boutures.

Le 10 novembre 1983 nous avons réalisé des boutures de Kumquat et d'orange Bokhobza en milieu stérile.

Dans des tubes de culture de 30 mm de diamètre nous avons stérilisé du gros sable pendant 1 heure à 120°C, auquel nous avons ajouté après stérilisation, de la solution stérilisée de MURASHIGE et SKOOG utilisée pour le microgreffage.

Les boutures de 5 à 10 mm de diamètre ont été stérilisées dans une solution d'eau de javel à 2 p. 100, rincées à l'eau stérile et insérées dans les tubes sous la hotte à flux laminaire, à raison d'une bouture par tube. Pour chaque variété nous avons utilisé deux paniers de 24 tubes. Un panier a été placé dans le phytotron réglé dans les conditions de température de thérapie (40°C pendant 16 heures le jour et 30°C pendant 8 heures la nuit et 80 p. 100 d'hygrométrie), alors que l'autre a été mis dans un incubateur à une température constante de 27°C et une photopériode de 16 heures.

Aucune jeune pousse n'a été obtenue aussi bien dans le phytotron que dans l'incubateur. Dans les deux cas on a observé un développement important et rapide de champignons qui ont entraîné la pourriture des boutures. Il est vraisemblable que la stérilisation superficielle des boutures à l'eau de javel n'était pas suffisante pour éliminer ces champignons.

Pour vérifier que l'échec enregistré n'était pas dû à la date de prélèvement des boutures, deux expériences semblables ont été successivement effectuées. Elles n'ont pas donné de meilleurs résultats.

Parallèlement des bouturages ont été également réalisés sous la serre chauffée.

Dans des pots en plastique contenant du gros sable humide non désinfecté nous avons placé des boutures d'une vingtaine de centimètres de longueur à raison de 12 par pot. Les pots ont été recouverts avec des sacs en polyéthylène de façon à maintenir une hygrométrie maximum au niveau de la partie aérienne des boutures.

Ces boutures ont émis des pousses au bout de 15 jours et un mois après leur mise en place nous avons effectué trois prélèvements successifs.

Le bouturage en serre donnant de bons résultats nous avons tenté le même bouturage mais en plaçant cette fois les pots dans le phytotron à une température constante de 32°C avec hygrométrie de 80 p. 100 et une photopériode de 16 heures. L'essai a été réalisé le 6 janvier 1984. Le 13 janvier, soit 7 jours plus tard, nous avons pu prélever les premières pousses (photo 6). Deux autres prélèvements ont été effectués sur les mêmes boutures, les 19 et 24 janvier. Les boutures conservées ont alors refusé d'émettre de nouvelles pousses et elles ont été supprimées.

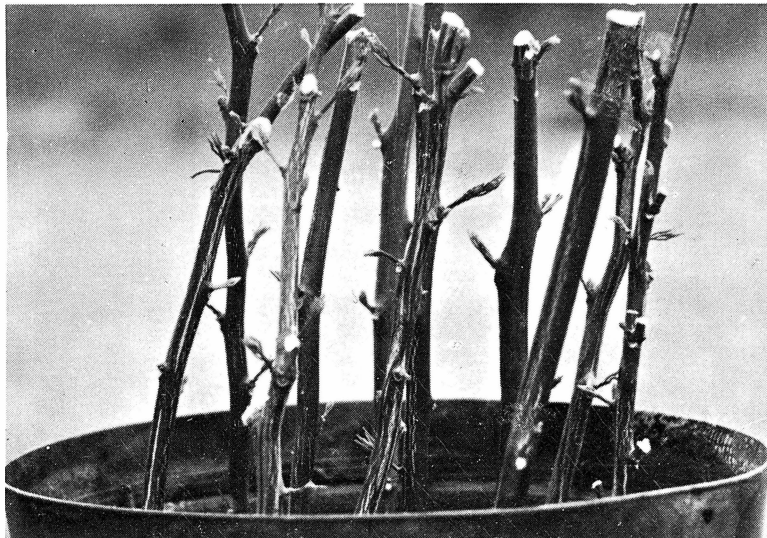
Le 25 février 1984 une nouvelle série de boutures a été mise en place dans les mêmes conditions mais en utilisant plusieurs lignées de Kumquat et la satsuma Okitsu Wase. Les prélèvements de pousses ont pu être effectués les 5, 9 et 20 mars.

Ces premiers résultats pouvant être jugés très satisfaisants le bouturage des pieds mères a désormais remplacé le greffage à la Station de San Giuliano. Ainsi chaque pot contenant une douzaine de boutures peut fournir une soixantaine de jeunes pousses utilisables pour le microgreffage «*in vitro*». Ce nombre de pousses n'avait jamais été obtenu sur un seul plant greffé. Cette technique présente donc l'avantage d'obtenir un grand nombre de pousses par pot, d'avoir un nombre important de pousses de la même lignée en peu de temps et donc d'augmenter la rapidité de régénération de cette lignée.

Les pots contenant les boutures pourront être conservés en serre chaude pendant la période de l'année où la température avoisinera 30°C et en phytotron pendant l'hiver.

L'amélioration du greffage «in vitro».

La technique de NAVARRO consiste à réaliser une coupe en T renversé au niveau de la coupe épicotylaire du porte-greffe et de placer le greffon sous les lèvres du T renversé. La coupe doit être nette.



Après le greffage, le porte-greffe émet très souvent des rejets au niveau des coupes qui ont été pratiquées, principalement autour de la coupe supérieure et à un degré moindre à l'insertion des cotylédons. Pour les éliminer, donc pour favoriser le développement du méristème, les tubes de culture sont ouverts sous la hotte et les repousses de porte-greffe sont coupées à l'aide de longs ciseaux. La difficulté de l'opération provient souvent du fait de la proximité de ces repousses avec le méristème qui oblige l'opérateur à sortir le jeune plant de son tube pour éliminer les rejets, ce qui peut être une cause de contamination par des champignons ou bactéries, surtout lorsque l'ébourgeonnage doit être renouvelé plusieurs fois.

Pour éviter ces inconvénients nous avons tenté de greffer à des niveaux inférieurs. Dans tous les cas l'écorce du porte-greffe était incisée par deux coupes horizontales et deux coupes verticales. Le carré d'écorce ainsi délimité était enlevé et remplacé par le greffon.

Outre la difficulté de la technique, nous nous sommes rapidement aperçu que le bourgeonnement au niveau de ces coupes était très important et qu'on n'apportait aucune amélioration au point de vue reprise du greffon. Nous l'avons donc abandonnée.

La pose du greffon sous les lèvres du T renversé n'est pas toujours aisée et il arrive que le méristème ne se place pas correctement dès la première fois. Dans ce cas l'opérateur est obligé de le manipuler un peu et les risques de blessures sont évidents malgré les précautions prises.

Après plusieurs essais de modification des coupes pratiquées sur le porte-greffe nous avons trouvé que la meilleure amélioration était apportée par une double fente verticale avec enlèvement d'un lambeau d'écorce d'environ 0,5 mm de largeur. En pratiquant ainsi, la pose du greffon est facilitée et le méristème est malgré tout maintenu en

Photo 6 - Bouturage de rameaux d'orange dans le phytotron à 32° C. Développement des jeunes pousses 7 jours après la mise en place des boutures.

place sur les deux côtés par l'écorce du porte-greffe. Cette technique est maintenant utilisée pour tous les microgreffages de méristème effectués en Corse.

Le second greffage.

D'après les promoteurs de la technique, les plants obtenus par microgreffage «*in vitro*» étaient repiqués 5 à 8 semaines après le greffage, sous serre, dans un mélange terreux et recouverts par des sacs en polyéthylène que l'on retirait progressivement.

Nous avons constaté que les plants sortant d'un tube de culture contenant du milieu nutritif pour passer dans un mélange terreux, subissaient un choc qui retardait considérablement leur développement. Ce choc est certainement dû, tout au moins en grande partie, à l'état déficient dans lequel se trouve le système racinaire du porte-greffe. En effet lors du greffage on a raccourci la racine et celle-ci n'a souvent pas eu le temps de reprendre son développement avant le repiquage. Lorsqu'un délai plus long sépare le greffage du repiquage on observe que la racine ne s'est pas ramifiée et qu'elle reste sous forme d'un pivot.

Dans les conditions de notre serre, de nombreux plants repiqués ont mal supporté le repiquage et sont morts, alors que d'autres ont refusé de se développer pendant plusieurs mois. Lorsque le démarrage s'effectuait enfin la croissance était lente.

En Afrique du Sud, DE LANGE a fait les mêmes constatations, aussi a-t-il tenté d'éviter le repiquage en greffant directement les jeunes plants microgreffés sur des semis bien enracinés de Rough lemon (*Citrus jambhiri* LUSH) d'environ 10 mm de diamètre, élevés sous serre (DE LANGE, 1978).

Sa technique de greffage consistait à enlever une languette d'écorce sur le porte-greffe et à plaquer à sa place le porte-greffe supportant le méristème après l'avoir taillé en biseau (schéma 2). Les plaies occasionnées étant relativement importantes, il était indispensable de recouvrir entièrement le greffon avec un lien de matière plastique pour éviter

son dessèchement. Une dizaine de jours après, le lien devait être enlevé puis remis en place, mais en laissant cette fois le méristème à l'air libre de façon à permettre son développement.

L'utilisation de la technique de DE LANGE nous a montré rapidement qu'elle était beaucoup trop compliquée et en particulier que les deux ligatures successives étaient la cause de risques élevés de casse du méristème. Nous avons alors mis en essai deux techniques de greffage beaucoup plus familières pour nous : la greffe de côté sous écorce (ou greffe en coulé) et la greffe en couronne (schémas 3 et 4). Dans les deux cas nous avons utilisé le *Citrus volkameriana* de semis comme porte-greffe. Dans nos

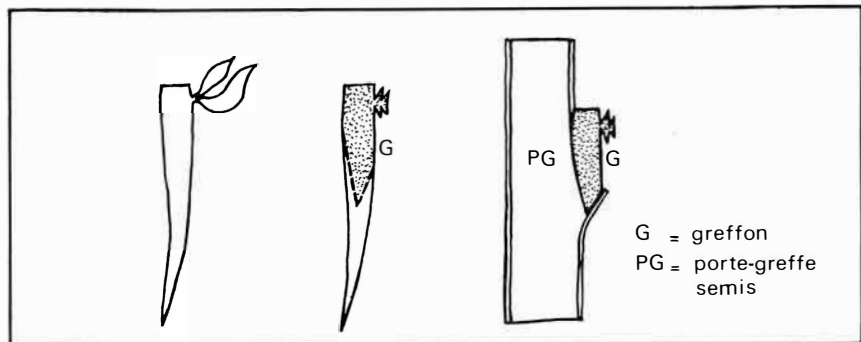


Schéma 2 • METHODE DE De LANGE.

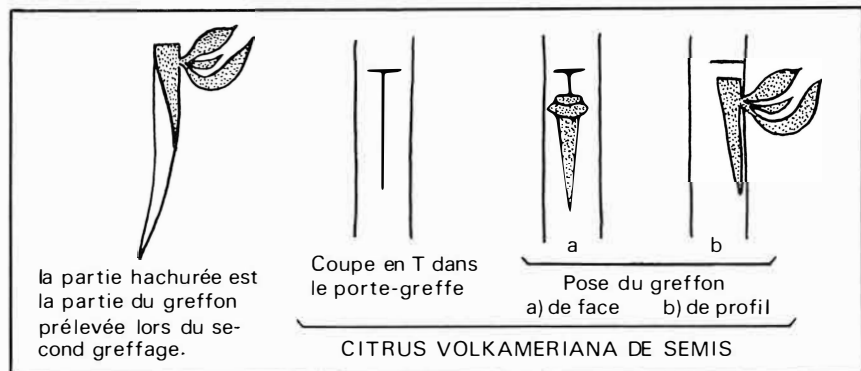


Schéma 3 • GREFFAGE DE COTE SOUS ECORCE.

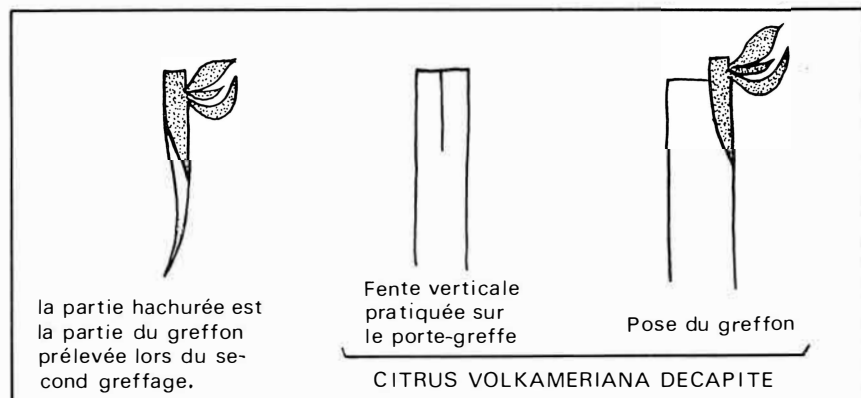


Schéma 4 • GREFFAGE EN COURONNE.

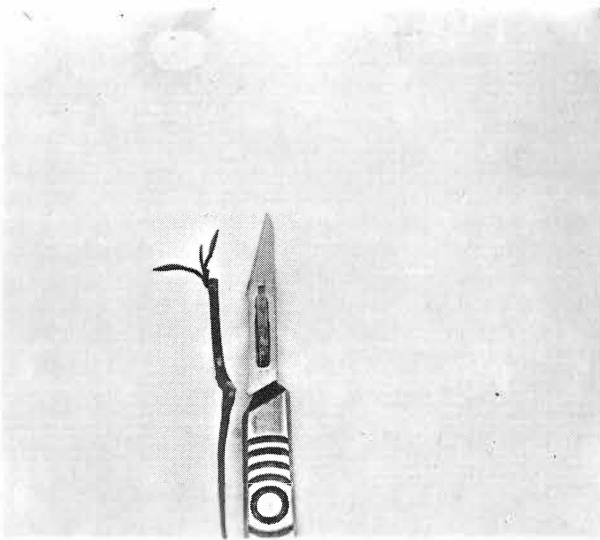


Photo 7 - Aspect du plant microgreffé à sa sortie du tube, prêt à subir le second greffage.

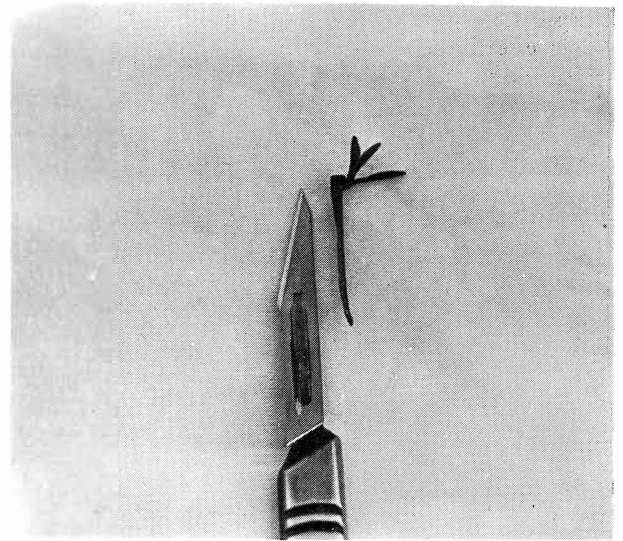


Photo 8 - Coupe en biseau pratiquée sur le plant lors du second greffage.

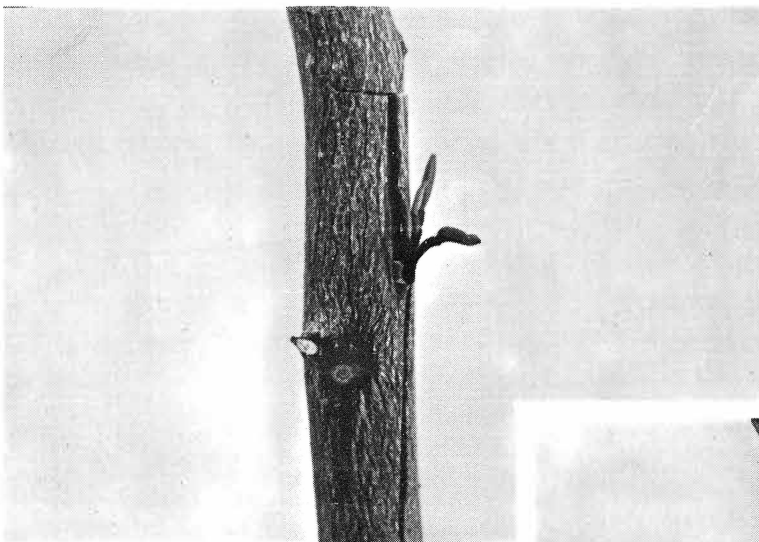


Photo 9 - Position du greffon sur le porte-greffe lors du second greffage.

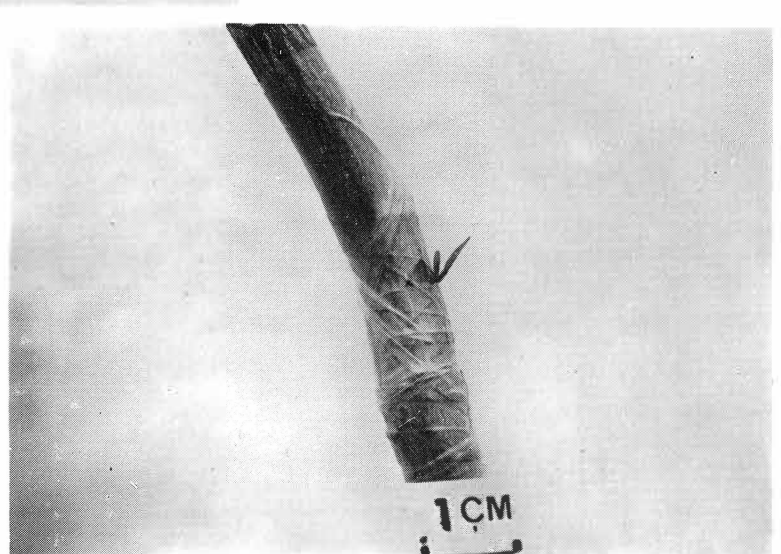


Photo 10 - Aspect de la greffe après ligature.

conditions de culture ce porte-greffe présente deux avantages : il est très vigoureux et il résiste bien à la gommose à *Phytophthora*, champignon du sol qui gêne souvent la culture des agrumes en pots. Ces *Citrus volkameriana* étaient élevés sous serre chauffée et avaient un diamètre compris entre 0,5 et 1 cm. Dans les deux cas également, les plants microgreffés avaient un méristème ayant émis deux ou trois feuilles au moment du second greffage.

● Greffe de côté sous écorce (schéma 3).

L'écorce du porte-greffe est incisée en forme de T (comme pour la greffe en écusson classique) alors que le greffon est coupé en biseau sur une longueur d'environ 2 cm (photos 7 et 8). Le greffon est introduit sous l'écorce du porte-greffe après soulèvement des lèvres de l'écorce du T. L'expérience nous a montré que l'extrémité supérieure du greffon ne devait pas coïncider avec la coupe supérieure du T, mais qu'il était préférable de faire glisser le greffon le plus bas possible de façon que les lèvres d'écorce du porte-greffe se rejoignent parfaitement au-dessus du greffon, permettant ainsi une meilleure protection de celui-ci contre le dessèchement (photo 9). Une ligature au lien de matière plastique recouvre au maximum la partie blessée mais laisse le méristème à l'air libre (photo 10). Le porte-greffe est ensuite coupé à une dizaine de cm au-dessus du méristème greffé.

L'attache s'est révélée être la partie la plus délicate de l'opération, principalement du fait de l'utilisation, au début, d'un film plastique trop large qu'il était souvent difficile d'enrouler autour du porte-greffe sans risque de casser le méristème. Cette difficulté de ligature nous a encouragée à essayer le second type de greffage : le greffage en couronne.

● Greffe en couronne (schéma 4).

Dans ce cas le porte-greffe est décapité, puis l'écorce est incisée verticalement à partir du sommet du porte-greffe sur une hauteur de 2 cm environ.

Le greffon est coupé de la même façon que pour la greffe de côté sous écorce. Le greffon est ensuite glissé sous l'écorce du porte-greffe grâce à l'incision pratiquée préalablement. La ligature au film plastique est aisée du

fait qu'elle n'intéresse que la partie située au-dessous du méristème et que les risques d'accrocher ce dernier sont faibles.

La comparaison des deux techniques de greffage s'est poursuivie pendant trois mois comme le montre le tableau 3.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 3 nous pouvons constater :

- le pourcentage de reprise générale est meilleur avec le greffage de côté sous écorce qu'avec le greffage en couronne.
- le pourcentage de reprise générale est assez satisfaisant, compte tenu des variations de température enregistrées dans la serre au cours de l'hiver. Ce pourcentage est dans tous les cas bien supérieur à celui enregistré avec le repiquage.

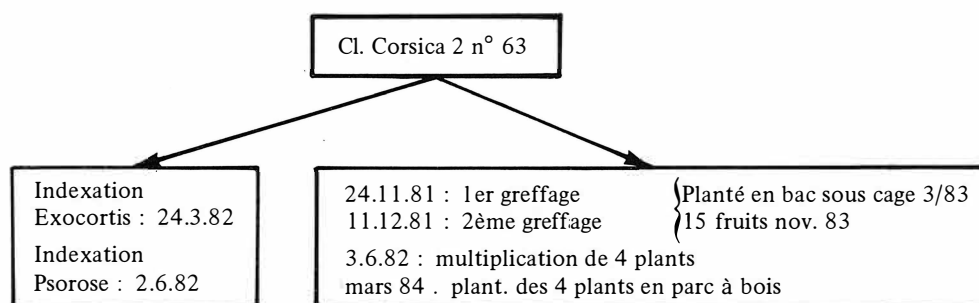
Dans les mois qui ont suivi nous avons remarqué que les plants issus du greffage en couronne, contrairement à ce que l'on pouvait attendre, se développaient plus lentement que ceux provenant du greffage de côté sous écorce. Aussi c'est cette dernière technique de greffage qui est utilisée en Corse depuis 1982 pour remplacer le repiquage dans les pots de terre.

Le développement des plants issus du second greffage est beaucoup plus rapide que celui qu'on obtenait précédemment avec les plants repiqués. Alors qu'avec les premiers plants repiqués nous avons attendu plus de 6 mois avant de pouvoir prélever quelques yeux pour effectuer une première multiplication et les premiers tests d'indexation, grâce au second greffage les délais ont été pratiquement réduits de moitié (photos 11 et 12).

A titre d'exemple, prenons le greffage de méristème n° 63 qui correspond à un clémentinier Corsica n° 2.

TABLEAU 3 - Comparaison des % de reprise entre les deux types de greffage.

Dates	Nbre greffes «en coulé»	% reprise	Nbre greffes en couronne	% reprise
1/11/81 - 30/11/81	5	100	13	84
1/12/81 - 31/12/81	9	55	13	46
1/1/82 - 31/1/82	17	76	13	61
Total :	31	74	39	64



deux ans après le premier greffage nous avons récolté les 15 premiers fruits (photo 13).
trois ans après, l'indexation était terminée et les premiers plants plantés en parc à bois.



Photo 11 - Développement d'une greffe de Satsuma 20 jours après le second greffage.

Résultats obtenus.

Entre septembre 1981 et avril 1984 nous avons obtenu par microgreffage de méristème «*in vitro*» 510 plants représentant 42 têtes de lignées se répartissant ainsi :

- 13 clones de clémentiniers
- 10 variétés d'orangers
- 6 variétés de mandariniers
- 4 variétés de citronniers
- 3 clones de kumquats
- 2 variétés de limequats
- 2 variétés de limettiers
- 1 variété de pomelo
- 1 variété de bergamotier

Les 200 premiers de ces plants ont subi tous les tests d'indexation et nous avons pu réaliser les premières observations pomologiques lors de la récolte de 1983-1984.

Les variétés mentionnées dans les tableaux 4 à 8 ont



Photo 12 - Clémentinier 5 mois après le second greffage.

été choisies pour diverses raisons.

- Les citronniers pour leur résistance au Mal Secco. L'introduction de la maladie en Corse entraînerait la destruction de la plupart des citronniers Eureka, variété très sensible à la maladie, pratiquement la seule à être cultivée dans l'île. L'obtention de variétés saines, résistantes, devrait permettre une reconversion rapide des plantations.

- Les clémentiniers, soit pour leur fructification abondante, soit pour la grosseur de leurs fruits, soit pour la précocité ou la tardiveté de l'époque de maturité des fruits.



Photo 13 - Fructification de clémentiniers
18 mois à 2 ans après leur sortie de tubes.

TABLEAU 4 - Pourcentage de reprise des microgreffages de citronniers.

Variétés	Nbre de greffages réalisés	Nbre de greffes de méristèmes reprises	% de réussite après le premier greffage	Nbre de plants obtenus après le 2ème greffage	% de réussite après le 2ème greffage	% final
Adamopoulos	20	7	35	5	71	25
Karystini	6	1	17	1	100	17
Maglini	31	13	42	8	61	26
Santa Teresa	6	2	33	1	50	17
Totaux	63	23	37	15	65	24

TABLEAU 5 - Pourcentage de reprise des microgreffages de clémentiniers.

Lignées	Nbre de greffages réalisés	Nbre de greffes de méristèmes reprises	% de réussite après le premier greffage	Nbre de plants obtenus après le 2ème greffage	% de réussite après le 2ème greffage	% final
Caffin	46	13	28	4	30	9
Carte noire	64	27	43	22	81	35
Corsica 1	61	23	38	16	69	26
Corsica 2	148	46	31	22	47	15
Corsica 3	59	20	34	10	50	17
GP	52	10	19	7	70	14
MA 1	136	42	31	30	71	22
MA 2	61	17	28		non terminé	
MA 3	33	17	52	12	70	36
Montréal	28	8	29	4	50	14
Nules	175	86	49	60	69	34
Oroval	53	28	53	18	64	34
Ragheb	19	7	37	5	71	26
Totaux :	935	344	37	210	64 *	24 *

* - Pourcentage ne tenant pas compte du Cl. MA 2 dont la régénération n'est pas terminée.

TABLEAU 6 - Pourcentage de reprise des microgreffages de mandariniers.

Variétés	Nbre de greffages réalisés	Nbre de greffes de méristèmes reprises	% de réussite après le premier greffage	Nbre de plants obtenus après le 2ème greffage	% de reprise après le 2ème greffage	% final
De Chios	18	5	28	3	60	17
Ellendale	125	44	35	28	63	22
Imperial	42	18	43	14	77	33
Ponkan	34	7	21	6	85	18
Satsuma	98	15	15	12	80	12
Sats. Okistu Wase	56	22		non terminé		
Totaux :	373	111	30	63	70 *	20 *

* - % ne tenant pas compte de la Satsuma OKITSU WASE dont la régénération n'est pas terminée.

TABLEAU 7 - Pourcentage de reprise des microgreffages d'orangers.

Variétés	Nbre de greffages réalisés	Nbre de greffes de méristèmes reprises	% de réussite après le premier greffage	Nbre de plants obtenus après le 2ème greffage	% de reprise après le 2ème greffage	% final
Bokhobza *	30	12	40 *		non terminé	
Dalmau	55	16	29	9	56	16
1/2 Saison n° 1	21	7	33	7	100	33
1/2 Saison n° 4	21	7	33	6	85	29
1/2 Sanguine						
Petit Pierre *	25	15	60 *		non terminé	
Grosse Sanguine	19	10	53	8	80	42
Maltaise Blonde*	21	14	67 *		non terminé	
Navel n° 1	61	22	36	17	77	28
Navel n° 2	53	15	28	13	86	25
Navel n° 3	58	11	19	7	63	12
Totaux	364	129	35	67	76 **	23 **

* - pousses prélevées sur pieds mères élevés dans le phytotron à 32°C constants.

** - pourcentages ne tenant pas compte des variétés : Bokhobza, 1/2 Sanguine Petit Pierre et Maltaise Blonde dont la régénération n'est pas terminée.

TABLEAU 8 - Pourcentage de reprise des microgreffages d'espèces diverses.

Variétés	Nbre de greffages réalisés	Nbre de greffes de méristèmes reprises	% de réussite après le premier greffage	Nbre de plants obtenus après le 2ème greffage	% de reprise après le 2ème greffage	% final
Kumquat	71	24		non terminé		
Limequat Eustis	9	5	56	3	60	33
Limequat Lakeland	30	13	43	9	69	30
Lime Bearss	17	8	47	4	50	24
Lime de Floride	42	34	81	24	71	57
Pomelo Wheeny	59	19	32	17	89	29
Bergamotier	78	22	28		non terminé	
Totaux :	306	125	40	57	68 *	35 *

* - % ne tenant pas compte des Kumquat et Bergamotier dont la régénération n'est pas terminée.

- Les mandariniers et les orangers : pour la précocité de la maturité de leurs fruits (Satsuma) ou pour l'obtention de variétés saines à partir d'introductions provenant de l'étranger.

- Les kumquats et limequats pour essayer d'éliminer une ou plusieurs maladies transmissibles qui seraient la cause d'incompatibilité au greffage sur Citrange Troyer.

- Les limettiers pour éliminer l'Exocortis de ces deux lignées introduites de Floride.

- Le pomelo pour éliminer la Tristeza de cette variété introduite d'Australie.

- Le bergamotier pour supprimer l'Exocortis et la Psorose écailleuse qui infectent tous les bergamotiers cultivés.

Le pourcentage de reprise aux greffages.

Le pourcentage de reprise au premier greffage est pratiquement le même pour les citronniers, clémentiniers et orangers puisqu'il atteint respectivement 37,37 et 35 p. 100 (tableaux 4, 5 et 7). Pour les mandariniers ce pourcentage de reprise est légèrement inférieur (30 p. 100) mais il sera encore augmenté lorsque la régénération de la Satsuma Okitsu Wase sera terminée (tableau 6). Au contraire pour les espèces diverses il est de 40 p. 100 (tableau 8). Ces chiffres sont à rapprocher de ceux donnés par NAVARRO qui signale un pourcentage général de reprise de 38 p. 100 en Espagne (NAVARRO, 1981).

Pour chaque espèce on note des pourcentages de reprise très variables d'une variété à une autre et d'une lignée à une autre. C'est ainsi que pour le clémentinier par exemple, on enregistre un pourcentage de reprise au premier greffage plus élevé pour les lignées Carte Noire, MA3, Nules et Oroval que pour les autres lignées. Il en est de même pour le citronnier Maglini et le mandarinier Impérial. Dans les espèces diverses, les limettiers et les limequats reprennent mieux au greffage que le pomelo ou le bergamotier. Il importe de souligner que ces pourcentages de reprise sont indépendants de l'époque à laquelle est effectué le premier greffage, l'utilisation d'enceintes climatisées toujours maintenues dans les mêmes conditions de température et d'hygrométrie évitant les variations saisonnières.

On remarquera dans le tableau 7 que les trois variétés d'orangers (Bokhobza, 1/2 Sanguine Petit Pierre et Maltaise Blonde) dont la régénération a été effectuée à partir de pousses obtenues par bouturage à une température constante de 32°C dans le phytotron, ont donné des pourcentages de reprise au greffage supérieurs aux autres variétés pour lesquelles les pousses avaient été récoltées en serre. La température à laquelle les pousses se sont développées semblerait donc avoir une influence sur la reprise au greffage du méristème. Cette observation est d'ailleurs confirmée par les résultats obtenus en thermothérapie comme nous le

verrons par la suite.

Si on considère maintenant les pourcentages de reprise au second greffage on note qu'ils varient surtout en fonction de la variété ou de la lignée considérée, puisque les différences entre les espèces sont relativement faibles (64 p. 100 pour les clémentiniers à 76 p. 100 pour les orangers). Il convient cependant de savoir qu'il est difficile de comparer les pourcentages de reprise au second greffage suivant les lignées ou les variétés, toutes n'étant pas greffées à la même époque de l'année et que les variations saisonnières enregistrées dans la serre peuvent avoir une influence sur la soudure des greffons. Des pannes du chauffage subies pendant l'hiver ont, par exemple, entraîné la mort de certains plants. Pour éviter ces inconvénients et améliorer la reprise au second greffage, une chambre d'élevage est en cours d'installation à la Station. Elle permettra de maintenir les plants à une température constante de 27°C après le second greffage avec une hygrométrie de 80 p. 100 et une photopériode de 16 heures.

La conformité pomologique.

En novembre 1983 les premiers fruits ont été récoltés sur les plants obtenus en novembre-décembre 1981. Il s'agissait en particulier de clémentiniers Corsica 1 et 2 sélectionnés pour leur abondante fructification et pour la maturité précoce de leurs fruits. Tous les fruits qui ont été récoltés présentaient les mêmes caractéristiques que ceux provenant des pieds mères malades. La régénération par microgreffage de méristème *in vitro* n'a donc pas modifié ces caractéristiques et elle a permis de conserver la précocité pour laquelle les arbres avaient été sélectionnés.

La mise à fruits très rapide obtenue sur les Kumquats régénérés par cette technique permet également de vérifier la conformité pomologique de ces variétés, souvent dans l'année même de la création de ces plants. Par contre il semble que pour les orangers par exemple, le second greffage retarde un peu la mise à fruits des plants par rapport au repiquage en pleine terre. Cet inconvénient est cependant largement compensé par le pourcentage des plants obtenus comme nous l'avons souligné précédemment.

Nous pouvons donc dire que pour l'instant, tous les plants qui ont fructifié étaient conformes pomologiquement aux caractères recherchés.

L'état sanitaire.

Les 200 premiers plants obtenus ont tous été indexés et les chiffres portés dans le tableau 9 donnent le pourcentage de plants malades décelés jusqu'ici.

Le contrôle sanitaire a été réalisé par test E.L.I.S.A. pour la Tristeza et par indexation sur plantes indicatrices pour l'Exocortis et les maladies induisant des symptômes foliaires «de Psorose».

TABLEAU 9 - Pourcentage de plants malades après recherche des différentes maladies.

Maladies recherchées	Nbre de plants indexés	Nbre de plants malades	% de plants malades
Exocortis	174	0	0
Tristeza	117	5	4
Maladies induisant des symptômes foliaires de Psorose	199	50	26

Les pieds mères à régénérer jusqu'ici étant indemnes de Cachexie-Xyloporose, l'indexation de cette maladie n'a donc pas été effectuée.

Nous pouvons constater que l'Exocortis a été éliminé dans tous les cas. Par contre 5 plants sur 117 ont été trouvés contaminés par la Tristeza et ont été détruits. D'après NAVARRO, en Espagne la maladie est éliminée à 100 p. 100 par le microgreffage de méristème *in vitro*. Il faut rappeler que dans ce pays la souche de Tristeza est relativement peu virulente et il est possible que les contaminations enregistrées en Corse proviennent du fait que la souche de Tristeza soit une souche introduite avec des greffons du Japon.

En ce qui concerne les symptômes foliaires «de Psorose» observés sur les plants obtenus, le tableau 10 donne les lignées contaminées. Le fort pourcentage de plants malades sur les lignées de clémentiniers Nules et Oroval nous a amenée à associer la thermothérapie au microgreffage de méristème *in vitro*, comme nous le verrons par la suite.

Discussion.

Le microgreffage de méristème *in vitro* tel qu'il est utilisé en Corse a déjà permis de régénérer un certain nombre de lignées de variétés d'agrumes. Le prélèvement des méristèmes avec deux ébauches foliaires comme nous le pratiquons permet d'obtenir des pourcentages de reprise au premier greffage équivalents à ceux enregistrés en Espagne où les méristèmes avec trois ébauches foliaires sont utilisés. La taille plus petite de nos méristèmes ne

nous met cependant pas à l'abri des contaminations en particulier par les agents induisant des symptômes foliaires «de Psorose». Comme il a été démontré par NAVARRO, les causes de ces contaminations sont certainement dues au fait que les pieds mères sur lesquels sont prélevées les jeunes pousses sont maintenus à une température trop basse. L'utilisation du bouturage en chambre à 32°C tel qu'il est maintenant pratiqué ou de la thermothérapie devrait réduire les pourcentages de plants malades.

Le second greffage a déjà donné des résultats bien supérieurs à ceux enregistrés avec le repiquage en terre des jeunes plants. L'utilisation prochaine d'une salle d'élevage devrait encore améliorer ces résultats.

LA THERMOTHERAPIE ASSOCIEE AU MICROGREFFAGE «IN VITRO»

But et description de la technique.

Comme nous l'avons indiqué précédemment la régénération par microgreffage *in vitro* des lignées contaminées par les maladies induisant des symptômes foliaires de Psorose ne nous a pas toujours donné des résultats satisfaisants puisque pour certaines d'entre elles nous avons obtenu un pourcentage de plants malades de 50 p. 100. C'est pour cette raison que nous avons été amenée à associer la thermothérapie au microgreffage *in vitro*.

GRANT après avoir trempé un certain temps des baquettes-greffons dans de l'eau chaude, a été le premier à obtenir des plants de Citrus indemnes de Psorose écaillée

TABLEAU 10 - Pourcentage de plants ayant manifesté des symptômes foliaires «de Psorose».

Lignées	Nbre de plants obtenus après 2ème greffage	Nbre de plants présentant des symptômes foliaires	% plants malades
Cl. Carte Noire	22	2	9
Cl. Corsica 2	23	7	30
Cl. Montréal	4	1	25
Cl. Nules	60	30	50
Cl. Oroval	18	9	50
Bergamotier	11	1	9

et de Tristeza en plaçant des jeunes plants malades dans une enceinte maintenue plusieurs mois à 38°C. (GRANT, 1957).

Par la suite la technique de thermothérapie a été améliorée. C'est ainsi que CALAVAN et al. ont montré que des jeunes plants d'agrumes malades pouvaient être débarrassés de certains virus en les plaçant dans une enceinte où la température variait entre 40°C pendant 16 heures le jour et 30°C pendant 8 heures la nuit. (CALAVAN et al., 1972).

Dans ces conditions les plants se comportaient mieux qu'à une température constante de 38°C. Ces auteurs pouvaient ainsi éliminer la plupart des virus contaminants en maintenant les plants dans ces conditions pendant plusieurs mois, mais le traitement était inefficace contre l'Exocortis et la Cachexie-Xyloporose.

Nous avons adopté la technique de CALAVAN et al. pour essayer d'obtenir des pousses indemnes des maladies induisant des symptômes foliaires de Psorose.

Matériel et méthodes utilisés en Corse.

A San Giuliano les essais de thermothérapie ont commencé le 18 avril 1983. Nous avons utilisé un phytotron (FISONS-600 H) (photo 14) dans lequel il est possible de placer 12 plants en pots de 5 litres. La température était réglée à 40°C entre 6 et 22 heures et 30°C entre 22 et 6 heures et l'hygrométrie maintenue à 80 p. 100.

Le premier essai a porté sur les plants suivants :

- 2 plants de Satsuma Okitsu Wase n° 2
- 2 plants de clémentinier MA 3
- 4 plants de clémentinier MA 1
- 4 plants de clémentinier Carte Noire

Toutes ces variétés avaient été greffées sur *Citrus volkameriana* sous serre et elles avaient entre 6 et 12 mois de greffage.

La moitié des plants de chaque lignée a été effeuillée au moment de l'entrée dans le phytotron pour voir si ceux-ci supportaient mieux le traitement. Après 15 jours nous avons observé que les plants non effeuillés perdaient leurs feuilles, aussi avons-nous supprimé toutes les feuilles restantes. Les deux plants de Satsuma Okitsu Wase, les plus jeunes, n'ont pas résisté au traitement et sont morts. Les deux remplaçants de la même variété et du même âge ont également subi le même sort.

Les plants des autres espèces ont commencé à émettre des pousses trois semaines après avoir été placés dans l'enceinte. Chaque plant a donné un nombre important de pousses, la plupart des bourgeons éclatant en même temps.

Pour le clémentinier Carte Noire, trois prélèvements ont suffi pour réaliser un nombre suffisant de microgreffage de méristème.

Pour les deux autres clémentiniers MA 1 et MA 3 nous avons effectué 7 et 6 prélèvements. Le 4 juillet nous avons obtenu suffisamment de plants microgreffés pour ces trois clones de clémentiniers.

Un second essai a été entrepris en novembre 1983 et s'est poursuivi jusqu'à la fin de l'année. Il avait pour but de régénérer le clémentinier Nules et l'oranger Grosse Sanguine sur lesquels les symptômes foliaires de «Psorose» étaient particulièrement marqués.

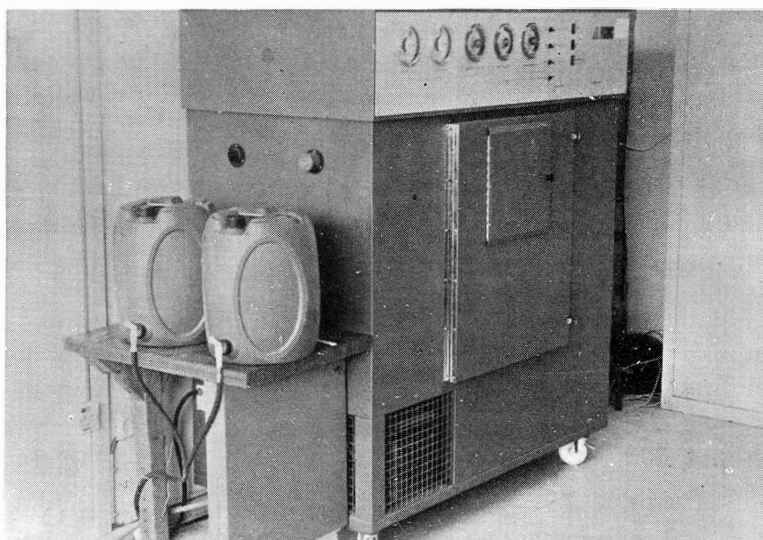


Photo 14 - Phytotron «FISONS 600 H» utilisé soit pour le bouturage des pieds mères malades à 32°C, soit pour la thermothérapie.

Résultats obtenus.

● Pourcentage de réussite.

Les clones de clémentiniers Carte Noire et Nules ont été étudiés avec et sans passage des pieds mères en enceinte de thermothérapie. Comme le montre le tableau 11 le pourcentage de reprise après le microgreffage est bien supérieur lorsque les pousses sont prélevées dans le phytotron. Il semblerait que les tissus des méristèmes excisés des pousses obtenues en enceinte de thermothérapie soient plus fermes que ceux des pousses récoltées sous serre ; ces tissus sont plus durs à couper. La fermeté des tissus de ces méristèmes pourrait expliquer le meilleur pourcentage de reprise au microgreffage.

Les résultats obtenus lors de ces deux essais de thermothérapie semblent donc montrer que les relatives hautes températures auxquelles sont obtenues les pousses d'agrumes ont une influence sur le pourcentage de reprise des microgreffes. Ces observations confirment celles décrites précédemment et consignées dans le tableau 7, où les trois variétés d'orangers élevées à 32°C constants donnaient des pourcentages de reprise au microgreffage supérieurs à ceux enregistrés avec des variétés cultivées sous serre.

Une panne du phytotron ne nous a pas permis de poursuivre les observations, mais d'autres essais seront entrepris dès qu'une autre variété nous donnera des pourcentages importants de contaminations par les symptômes foliaires de «Psorose».

● Conformité pomologique.

Les plants microgreffés obtenus après passage des pieds mères malades dans le phytotron sont jeunes puisqu'ils ont moins d'un an et n'ont pas encore fructifié. Nous pouvons seulement indiquer, que tous les pieds mères issus de ce traitement ont bien des feuilles identiques aux lignées de clémentiniers parentes.

● Etat sanitaire.

Les plants issus du microgreffage *in vitro* dont les pousses ont été prélevées sur les pieds mères élevés dans l'enceinte de thermothérapie n'ont pour l'instant manifesté aucun symptôme foliaire de «Psorose». Leur indexation sur plantes indicatrices est en cours.

Discussion.

Bien que trop peu nombreux, les essais de thermothérapie tels qu'ils ont été réalisés à San Giuliano, semblent montrer que les températures relativement élevées subies par les plants d'agrumes ont une influence bénéfique sur le pourcentage de reprise des microgreffes. Il est vraisemblable que ces températures modifient la turgescence des tissus et permettent ainsi une meilleure soudure du greffon sur le porte-greffe. Des essais complémentaires sont cependant nécessaires pour confirmer ces observations.

Les tests d'indexation sur plantes indicatrices sont encore trop récents pour nous permettre de connaître l'efficacité de la thermothérapie sur la contamination des plants microgreffés par les maladies induisant des symptômes foliaires de «Psorose». Il faut cependant remarquer que le clémentinier manifeste très bien lui-même ces symptômes foliaires et qu'il constitue en quelque sorte une plante indicatrice à ne pas négliger. A ce sujet on remarquera que les symptômes foliaires recherchés ont déjà été observés sur des plants des trois lignées de clémentiniers expérimentés, mais uniquement sur ceux sans thermothérapie. Ces symptômes foliaires sont apparus sur des plants, 2 à 3 mois après le second greffage alors que les premiers pieds mères issus de thermothérapie sont âgés d'un an environ.

La conformité pomologique des variétés traitées par thermothérapie n'a pas non plus été vérifiée puisqu'aucun des pieds mères obtenu n'a fructifié pour l'instant. L'examen des feuilles au cours de l'année 1983 et l'apparition des premières fleurs au printemps 1984 nous permettent de

TABLEAU 11 - Pourcentage de reprise après le microgreffage.

Variétés	Nbre de greffages réalisés	Nbre de greffe ayant démarré	% de reprise après le premier greffage
Cl. Carte Noire			
- sans thermothérapie	23	5	22
- avec thermothérapie	40	22	55
Cl. MA 1			
- sans thermothérapie	69	15	22
- avec thermothérapie	67	27	40
Cl. Nules			
- sans thermothérapie	22	8	36
- avec thermothérapie	50	25	50

penser que nous ne devrions pas observer la présence de caractères aberrants sur ces plants. Nous espérons obtenir une confirmation de ces observations à l'automne 1984 avec la récolte des premiers fruits.

Enfin il s'est avéré que les plants destinés à subir le traitement de thérapie doivent être suffisamment âgés pour résister. Les greffes de moins d'un an d'âge dépérissent avant d'émettre des jeunes pousses. On a intérêt à effeuiller les plants avant leur entrée dans l'enceinte.

CONCLUSION

Actuellement la technique du microgreffage de méristème d'agrumes *in vitro* est utilisée dans la plupart des pays agrumicoles pour l'obtention des lignées saines.

Cette technique permet de régénérer toutes les espèces et variétés d'agrumes et en particulier les monoembryonnées qu'on était auparavant incapable d'assainir. Pour les variétés polyembryonnées, elle remplace avantageusement la sélection nucellaire puisqu'elle est plus rapide et que les plants obtenus ne présentent pas de caractères juvéniles.

Les améliorations apportées en Corse à la technique décrite par NAVARRO et en particulier le bouturage en enceinte à 32°C des plants devant fournir les jeunes pousses, ouvrent de nouvelles perspectives. En effet il était auparavant extrêmement dangereux d'introduire des greffons d'agrumes des pays étrangers et en particulier de ceux où la Tristeza est endémique, les risques de propagation de la maladie étant très importants malgré toutes les mesures de quarantaine qui pouvaient être prises. Aujourd'hui cette introduction peut être envisagée si on bouture dans une enceinte les greffons dès leur arrivée et si on détruit les plants dès la fin du prélèvement des pousses.

Le second greffage a aussi amélioré considérablement les conditions d'obtention des plants régénérés en évitant la période la plus critique, c'est-à-dire l'adaptation des jeunes plants au milieu sol.

Enfin l'utilisation de la thérapie paraît indispensable à la régénération des variétés les plus contaminées par les maladies induisant des symptômes foliaires de «Psorose» pour lesquelles le microgreffage de méristème *in vitro* ne semble pas suffisant.

En Corse le microgreffage de méristème *in vitro* a déjà permis d'obtenir plus de 500 pieds mères représentant 42 têtes de lignées. Parmi celles-ci figurent les différentes sélections de clémentiniers que la Station de Recherches Agronomiques de San Giuliano s'est engagée, vis-à-vis des organisations professionnelles, à fournir dans le cadre du plan de reconversion agrumicole de l'île défini par les textes communautaires européens. Moins de trois ans après leur sortie de tubes ces lignées de clémentiniers ont été vérifiées à la fois au point de vue sanitaire et pomologique,

ont été multipliées intensivement et ont déjà pu fournir plus de 80.000 yeux au printemps 1984. Pour les autres lignées, des parcelles «parc à bois» sont constituées qui permettront à la fois de prélever des greffons et de vérifier leur comportement.

Grâce à la technique du microgreffage de méristème *in vitro* on peut envisager le remplacement de toutes les lignées plus ou moins contaminées des collections par des lignées régénérées donc saines.

ANNEXE 1

Milieu de MURASHIGE et SKOOG.		en mg/l	
I	Nitrate d'ammonium	1650	
	Nitrate de potassium	1900	
	Sulfate de magnésium	370	
	Sulfate de manganèse	16,9	
	Sulfate de zinc	8,6	
	Sulfate de cuivre	0,025	
	Chlorure de calcium	440	
	II	Iodure de potassium	0,83
		Chlorure de cobalt	0,025
	Dihydrogénophosphate de potassium	170	
	Acide borique	6,2	
	Molybdate de sodium	0,25	
	Sulfate de fer	25,85	
	Acide Ethylènedinitrotétracétique	37,25	
	Thiamine Hcl	0,2	
	Pyridoxine Hcl	1,0	
	Acide nicotinique	1,0	
Inositol	100		
	Saccharose ¹	75 g	
	Gélose ²	10 g	
	Milieu de germination des porte-greffe : II+ 2		
	Milieu d'élevage des plants microgreffés : I+ 1		

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre du programme de recherches de la Station de Recherches Agronomiques (S.R.A.) de San Giuliano (Haute Corse).

J'exprime ma sincère reconnaissance à tous ceux qui m'ont apporté leur aide pour la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier très respectueusement Monsieur le Professeur J. SECHET qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury.

Mes vifs remerciements vont aussi à Monsieur le Professeur J. EYME et Monsieur le Professeur J.M. BOVE pour avoir eu l'amabilité de juger ce mémoire.

Monsieur R. VOGEL a accepté de diriger ce travail. II

m'a sans cesse prodigué conseils et encouragements. J'ai bénéficié de ses larges connaissances scientifiques et il m'a toujours assuré son soutien moral. Ses critiques et remarques m'ont beaucoup aidée dans la rédaction de cet exposé.

Que Monsieur VOGEL trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance et de ma profonde gratitude.

Que Monsieur F. LELIEVRE, directeur de la S.R.A., soit aussi remercié pour m'avoir accordé toute liberté dans l'accomplissement de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à tous mes collègues de travail, qui de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

- BLONDEL (L.). 1970.
La recherche agrumicole en France.
La Voix de la Corse agricole, nov. 1970, p. 15-22.
- BRIDGES (G.D.), YOUTSEY (C.O.) and NIXON (R.R.). 1965.
Observations indicating Psorosis transmission by seed of Carrizo Citrange-Citrus.
Ind. Bartow, 46, 12, 5-6 et 14.
- CALAVAN (E.C.), ROISTACHER (C.N.) and NAUER (E.M.). 1972
Thermotherapy of Citrus for inactivation of certain viruses
Plant Disease Reporter, 56, 11, 976-980.
- CASSIN (P.J.). 1982.
Données succinctes actuelles sur l'agrumiculture mondiale
Symposium sur la Lutte contre les diverses maladies à Phytophthora. Marrakech 28 au 30.4.1982.
- CHILDS (J.F.L.) and JOHNSON (R.E.). 1966.
Preliminary report of seed transmission of Psorosis virus
Plant Disease Reporter, 50, 2, 81-83.
- DE LANGE (J.H.). 1978.
Shoot-tip grafting : A modified procedure.
Citrus and Subtropical Fruit J., 539, 13-15.
- FAWCETT (H.S.) and COCHRAN (L.C.).
Resistance of Citrus tissue and Psorosis virus A to heat.
Phytopathology, 31, 9, 861.
- GRANT (T.J.). 1957.
Effect of heat treatments on Tristeza and Psorosis viruses in Citrus.
Plant Disease Reporter, 41, 4, 232-234.
- KITAJIMA (E.W.), SILVA (D.M.), OLIVEIRA (A.R.), MULLER (G.W.) and COSTA (A.S.). 1964.
Thread like particles associated with Tristeza disease of Citrus.
Nature, 201, 1011-1012.
- MARGARA (J.). 1982.
Bases de la multiplication végétative.
- MOREL (G.) et MARTIN (C.). 1952
Guérison des dalhias atteints d'une maladie à virus.
C.R. Acad. Sc., 235, 1324-1325.
- NAVARRO (L.), ROISTACHER (C.N.) and MURASHIGE (M.T.). 1975.
Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for free Citrus.
J. Amer. Soc. Hort. Sci., 100, 471-479.
- NAVARRO (L.). 1979.
Microinjerto de apices caulinares *in vitro* para obtención de plantas de agrios libres de virus.
Bol. Serv. Plagas, 5, 127-148.
- NAVARRO (L.), JUAREZ (J.), BALLESTER (J.F.) and PINA (J.A.).
Like symptoms by shoot-tip grafting *in vitro*.
Se I.O.C.V., 162-166.
- NAVARRO (L.). 1981.
Citrus shoot-tip grafting *in vitro* (S.T.G.) and its applications : a review.
Proc. Int. Soc. Citriculture.
- NICOLI (Maryse), VOGEL (R.) et CASSIN (J.). 1982.
La régénération des agrumes par le greffage de méristème.
Bulletin de la SOMI.VAC, oct. 1982, n° 104, p. 41-46.
- NORMAN (P.A.) and CHILDS (J.F.L.). 1963.
Attempted transmission of Xyloporosis of Citrus with insects.
Proc. Fla. St. Hort. Soc. Miami, Nov. 63, vol. 76, 48-50.
- OLSON (E.O.). 1965.
Evidence that Xyloporosis virus does not pass through seeds of Palestine sweet lime.
Proc. 3a Conf. Intern. Org. Citrus Virol., p. 86-89.
- PUJOL (A.R.). 1966.
Transmission de Psorosis à travers la semilla de Citrange Troyer.
INIA Concordia, Serie Técnica, n° 10, p. 1-7.
- SAGLIO (P.), LAFLECHE (D.), BONNISSOL (C.) et BOVE (J.M.). 1971.
Isolement et culture *in vitro* des mycoplasmes associés au Stubborn des agrumes et leur observation au microscope électronique.
C.R. Acad. Sc. Paris, T 272, p. 1397-1390.
- VIGNAULT (J.C.), JOVE (J.M.), SAILLARD (C.), VOGEL (R.), FARRO (A.), VENEGAS (L.), STEMMER (W.), AOKI (S.), MACKOY (R.), AL BELDAWI (A.S.), LARUE (M.), TÚZCU (Ö.), OZSAN (M.), NAHMI (A.), ABASSI (M.), BONFILS (J.), MOUTOUS (G.), FOS (A.), POUTIERS (F.) et VIENNOT-BOURGIN (G.).
Mise en culture de spiroplasmes à partir de matériel végétal et d'insectes provenant de pays circum méditerranéens et du Proche-Orient.
C.R. Acad. Sc. Paris, T 290, 775-778.
- VOGEL (R.). 1973.
L'amélioration sanitaire des agrumes par l'indexation.
Rapport D.E.A., 55 p.
- VOGEL (R.). 1978.
Principaux résultats obtenus en Corse depuis 1974 en matière de virologie et de mycoplasmodologie des Citrus.
Fruits, 33, 11, 738-742.
- VOGEL (R.) et BOVE (J.M.). 1964.
Stem-pitting sur bigaradier et sur oranger «Tarocco» en Corse : une maladie à virus.
Fruits, 19, 269-274.
- VOGEL (R.) et BOVE (J.M.). 1969.
Relation of Cristacortis virus to other Citrus viruses.
Proc. 5th. Conf. Intern. Org. Citr. Virol., 1972, 178-184.
- VOGEL (R.) et BOVE (J.M.). 1972.
What is the causal agent of the leaf symptoms associated with Cristacortis disease of Citrus ?
Proc. 6th. Conf. Intern. Org. Citrus Virol.
- VOGEL (R.) et BOVE (J.M.). 1976.
La nouvelle technique d'indexation de la Cachexie-Xyloporose : son utilisation en Corse.
Fruits, 31, 2, 93-96.
- VOGEL (R.) et BOVE (J.M.). 1977.
Nouvelles données sur la Frisolée-Panachure infectieuse des agrumes en Corse.
Fruits, Fev. 1977, 32, 2, 93-103.