

Sélection et évaluation de lignées de cals stables et tolérantes vis-à-vis du stress salin chez le citrange 'Troyer' [*Citrus sinensis* (L.) × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]

Houda EL YACOUBI, Atmane ROCHDI*, Koutoua AYOLIE, Abdellatif RACHIDAI

Université Ibn Tofail, Faculté des Sciences, laboratoire Agrophysiologie et biotechnologie de culture *in vitro*, BP 133, Kenitra 14000, Maroc
at_rochdi@yahoo.com

Selection and evaluation of stable salt-tolerant callus cell lines of the Troyer citrange.

Abstract — Introduction. Citrus fruits are sensitive to salinity. Our study aimed at selecting cellular lines tolerant to NaCl of citrange Troyer and assessing the characters involved in salt stress responses in callus cultures. **Materials and methods.** Calli were cultivated on a culture medium containing NaCl whose concentration was gradually increased until it reached 8 g NaCl·L⁻¹. They were then transferred onto a medium without NaCl to test their independence with respect to the salt, then placed in the presence of 8 g NaCl·L⁻¹ to test their stability. Dosages of the content in soluble Na⁺, K⁺, proline and sugars contained in the calli were carried out at the end of the experiment. **Results and discussion.** Salinity stopped the calli from growing and caused the majority of the explants (sensitive calli) to become brown. Tolerant calli presented a growth comparable with the growth of the controls. The transfer of these calli onto medium without NaCl followed by their transfer onto saline culture medium showed the independence and the stability of the selected character of tolerance. The content in K⁺ of the tolerant calli was close to that of the control calli, but it was greater than that of the sensitive calli. On the other hand, the content in Na⁺ ions in the tolerant and sensitive calli was relatively higher than that of the control calli. Sodium would thus be accumulated in two cellular levels according to the type of callus: invasion of the cytosol (toxic effect) for the sensitive calli or vacuolar partitioning for the tolerant calli. Salinity caused the accumulation of proline and soluble sugars in the tolerant calli but not in the sensitive calli. **Conclusions.** Stable and tolerant cellular lines in NaCl were obtained starting from embryos of citrange Troyer. This tolerance could be related to changes in the properties of ion migration and in the regulation capacity and ionic partitioning. Accumulation of proline and soluble sugars constitutes a metabolic character to adaptive value that could be an indicator of tolerance to salinity.

Morocco / *Citrus* / citranges / *in vitro* culture / callogenesis / salt tolerance

Sélection et évaluation de lignées de cals stables et tolérantes vis-à-vis du stress salin chez le citrange 'Troyer' [*Citrus sinensis* (L.) × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.].

Résumé — Introduction. Les agrumes sont sensibles à la salinité. Notre étude a cherché à sélectionner, chez le citrange Troyer, des lignées cellulaires tolérantes à NaCl, à évaluer l'effet du sel sur la croissance des cals et à doser les solutés susceptibles d'être impliqués dans leur réponse au stress salin. **Matériel et méthodes.** Des cals ont été cultivés sur un milieu de culture contenant du NaCl dont la concentration a été augmentée progressivement jusqu'à atteindre 8 g NaCl·L⁻¹. Ils ont ensuite été transférés sur un milieu sans NaCl pour tester leur indépendance vis-à-vis du sel, puis remis en présence de 8 g NaCl·L⁻¹ pour tester leur stabilité. Des dosages de solutés (Na⁺, K⁺, proline et sucres solubles) contenus dans les cals ont été effectués à la fin de l'expérimentation. **Résultats et discussion.** La salinité a ralenti la croissance et provoqué le brunissement de la plupart des explants (cals sensibles). Les cals tolérants ont présenté une croissance comparable à celle des témoins. Le transfert de ces cals sur un milieu sans NaCl suivi de leur remise en culture sur milieu salin a démontré l'indépendance et la stabilité du caractère de tolérance sélectionné. La teneur en K⁺ des cals tolérants a été voisine de celle des cals témoins, mais plus élevée que celle des cals sensibles. En revanche, la teneur en ions Na⁺ des cals tolérants et sensibles a été relativement plus élevée que celle des témoins. Le sodium s'accumulerait donc à deux niveaux cellulaires selon le type de cals : envahissement du cytosol (effet toxique) pour les cals sensibles ou compartimentage vacuolaire pour les cals tolérants. La salinité a provoqué l'accumulation de proline et de sucres solubles dans les cals tolérants mais pas dans les cals sensibles. **Conclusions.** Des lignées cellulaires stables et tolérantes au NaCl ont été obtenues à partir d'embryons de citrange Troyer. Cette tolérance pourrait être liée à des changements dans les propriétés de transport des ions et dans la capacité de régulation et de compartimentage ionique. L'accumulation de solutés organiques constitue un caractère métabolique à valeur adaptative qui pourrait être un indicateur de tolérance au stress salin des cals.

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 17 avril 2004
Accepté le 17 juillet 2004

Fruits, 2004, vol. 59, p. 325–337
© 2004 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved
DOI: 10.1051/fruits:2004031

RESUMEN ESPAÑOL, p. 337

Moroc / *Citrus* / citrange / culture *in vitro* / callogénèse / tolérance au sel

1. Introduction

La résistance à la salinité est un caractère complexe, multigénique et contrôlé à différents niveaux d'organisation, de la cellule à la plante entière. Chez les agrumes, glyco-phytes sensibles au stress salin [1], la tolérance est associée à la restriction du transport des ions salins de la racine vers la partie aérienne [2]. En outre, pour les arbres fruitiers, la possibilité de transmission du caractère de tolérance à la salinité a déjà été démontrée [3]. Toutefois, chez ces espèces, les procédés classiques d'amélioration par hybridation sont parfois inefficaces vis-à-vis de la tolérance à la salinité du fait des difficultés à utiliser la variabilité préexistante par ces méthodes conventionnelles (nature quantitative de la résistance, polyembryonie nucellaire, haut degré d'hétérozygotie, stérilité gamétique, etc.) [4].

Ces observations ont orienté les recherches vers l'utilisation de certaines techniques de culture *in vitro*, sources de variation, pouvant intervenir dans les programmes d'amélioration visant l'acquisition de la tolérance à la salinité et contribuer à élucider les mécanismes cellulaires concourant à cette tolérance. Ainsi, la culture *in vitro* a été utilisée soit pour sélectionner des lignées cellulaires tolérantes à la salinité [5], soit pour élargir la variabilité des vitroplants chez quelques espèces [6]. Cependant, les techniques de biotechnologie n'ont pas toujours donné des résultats positifs du fait de l'instabilité et de la perte du caractère de tolérance après transfert des cultures sur le milieu dépourvu d'agent stressant sélectif.

Par ailleurs, la comparaison entre les cellules sélectionnées et non sélectionnées vis-à-vis du caractère de résistance à la salinité a permis de mettre en évidence divers mécanismes physiologiques qui contribuent à l'adaptation des cellules au stress salin. Ainsi, Stavarek et Rains [7] ont montré que la tolérance des cellules à NaCl était corrélée avec la capacité de régulation ioniques. Certaines études montrent également que les cellules tolérantes du tabac [8] accumulent les ions Na^+ et Cl^- . En revanche, les cellules tolérantes d'agrumes [9] survivent à la salinité par évitement partiel de NaCl. D'autres auteurs ont montré que, chez les agrumes, la tolérance des cals peut être associée à la

rétenion d'ions K^+ [10–12] et sur une large gamme de concentrations salines, le potassium interne a pu être trouvé linéairement et positivement corrélé avec la croissance [13].

Notre étude s'insère dans un programme de valorisation des milieux salins. Dans une première étape, elle a eu pour objectif de sélectionner, chez le citrange Troyer (portegreffe hybride résistant à la tristeza mais sensible au stress salin), des lignées cellulaires tolérantes vis-à-vis du NaCl ; dans une deuxième étape, elle a permis d'évaluer l'effet du sel sur la croissance des cals et de déterminer le dosage en solutés (K^+ , Na^+ , proline et sucres solubles) susceptible d'intervenir dans la réponse de ces cals au stress salin. La régénération de plants résistants au sel constituerait la troisième étape permettant de valoriser certains milieux salins ; elle n'a cependant pas été envisagée dans les travaux présentés.

2. Matériel et méthodes

2.1. Initiation des cals

Des graines polyembryonnées de citrange Troyer [hybride inter-générique de *Citrus sinensis* (L.) × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.], génétiquement hétérogènes, ont été stérilisées et un seul embryon a été prélevé par graine. Ces embryons ont été excisés, c'est-à-dire débarrassés de leurs cotylédons, et ensemencés par lot de trois dans des boîtes de Petri contenant un milieu de culture, dit de callogenèse, de Murashige et Tucker [14] additionné de 50 g de saccharose $\cdot\text{L}^{-1}$, 1 mg de 2,4-D $\cdot\text{L}^{-1}$ et 5 mg de BAP $\cdot\text{L}^{-1}$. Le milieu de culture a été solidifié par 8 g d'agar (Difco Bacto agar) $\cdot\text{L}^{-1}$ et le pH a été ajusté à 5,7 avant autoclavage (20 min à 120 °C). Les explants ont été incubés à 30 °C à l'obscurité et les cals obtenus après 1 mois ont été repiqués sur un milieu frais de même composition.

2.2. Détermination de la concentration saline sélective

Pour déterminer la dose de sel apte à cribler des lignées de cals tolérants vis-à-vis du

NaCl, 120 portions de calcs, homogènes, de couleur jaune clair, de texture friable et de masse initiale de 0,2 g de matière fraîche équivalant à 0,013 g de matière sèche ont été détachées après 2 mois de culture sur milieu d'initiation. Ces fragments de calcs ont été mis en culture durant (1 ou 2) mois sur le milieu d'initiation précédemment décrit, enrichi cependant en différentes concentrations de NaCl [(0, 4, 6, 8 ou 9) g NaCl·L⁻¹]. Les explants ont été répartis par trois en boîte de Petri et à raison de quatre boîtes par concentration saline testée (cinq concentrations), cela pour chacune des durées [(1 ou 2) mois] de stress testées. À l'issue de chacune de ces durées, douze explants par concentration ont été prélevés et pesés pour déterminer leur masse de matière fraîche puis sèche après un séjour de 24 h à 85 °C. Le taux d'accroissement de la masse [TC = (masse finale – masse initiale) / masse initiale], rapporté en pourcentage du témoin [TCR = (TC_{explants stressés} / TC_{explants témoins}) × 100] a alors été déterminé.

2.3. Sélection de calcs tolérants à NaCl

Un total de 1400 fragments (0,2 g matière fraîche) de calcs, provenant de calcs âgés de 2 mois, ont été cultivés pendant 1 mois sur le milieu de callogenèse en présence de 4 g NaCl·L⁻¹. L'ensemble de ces fragments a ensuite été transféré sur le même milieu mais additionné de 6 g NaCl·L⁻¹ pendant un deuxième mois et, enfin, sur un milieu contenant 8 g NaCl·L⁻¹ pendant un troisième mois de stress salin sélectif. Parallèlement, 300 autres fragments de calcs témoins ont été repiqués sur le milieu de callogenèse. À la fin de chacune des phases de ce stress salin progressif, le phénotype des calcs (texture et couleur avec présence ou absence de zones nécrosées) a été noté. La masse de matières fraîche et sèche a été mesurée en fin d'expérimentation sur des échantillons de douze calcs prélevés de façon aléatoire et représentatifs de chaque type : témoins (calcs cultivés en absence de NaCl), tolérants (calcs d'aspect friable, à couleur jaune clair, ayant une taille équivalente à celle des témoins) ou sensibles (calcs à croissance inhibée plus compacts et plus bruns). Le taux d'accroissement

a alors été calculé par rapport à la masse de matière initiale.

Après le troisième mois de ce stress salin progressif, tous les calcs ont alors été transférés sur le milieu de callogenèse sans NaCl, sur lequel ils ont été laissés alors pendant 2 mois (test d'indépendance vis-à-vis du sel pour les calcs tolérants). L'ensemble des calcs a ensuite été remis en présence de 8 g NaCl·L⁻¹ pendant deux autres mois afin de vérifier la stabilité du caractère de tolérance des calcs sélectionnés (test de stabilité). Parallèlement, les calcs témoins ont été repiqués mensuellement sur le milieu de callogenèse sans NaCl. La masse de matière fraîche et son taux d'accroissement ont été déterminés à la fin du test d'indépendance, puis à (1 et 2) mois au cours du test de stabilité sur des échantillons de douze calcs représentatifs de chaque type.

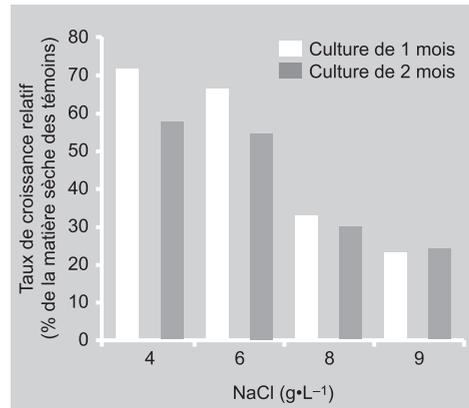
2.4. Dosages de soluté

À la fin du processus de sélection, quatre échantillons représentatifs de chaque type de calcs (témoins, tolérants et sensibles) ont été utilisés pour les dosages minéraux et organiques. La teneur en proline a été déterminée par colorimétrie à 528 nm à l'aide du réactif à la ninhydrine [15], après extraction par broyage des tissus (0,1g de matière fraîche) en présence de 3 mL de méthanol (40°) et chauffage au bain-marie à 80 °C durant 30 min. Les sucres solubles totaux ont été dosés à 625 nm à l'aide du réactif à l'antrone [16], après extraction par broyage des tissus (0,1 g de matière fraîche) en présence de 5 mL d'éthanol (80°) et chauffage au bain-marie à 80 °C durant 30 min. Les teneurs en ions Na⁺ et K⁺ ont été déterminées, après minéralisation de 0,1 g de matière sèche, par photométrie de flamme [17], Na⁺ à 590 nm et K⁺ à 680 nm.

2.5. Étude statistique

Le dispositif expérimental a été bâti sur un modèle aléatoire. Les données quantitatives ont été traitées par le logiciel SAS pour l'analyse de variance et par le test de Duncan pour la comparaison des moyennes significativement différentes.

Figure 1.
Variation du taux d'accroissement relatif de la masse de matière sèche de cals de citrange Troyer en fonction de concentrations croissantes en NaCl ajoutées au milieu de culture et de la durée de culture.



3. Résultats et discussion

3.1. Effet de diverses concentrations en NaCl sur la croissance des cals

La salinité du milieu a réduit la croissance des cals (*figure 1*). En effet, aux concentrations de (8 et 9) g NaCl·L⁻¹, le taux de croissance relatif des cals a été fortement diminué par rapport aux témoins puisque leur matière sèche a représenté 35 % et 25 % de celle des témoins, respectivement. En revanche, en présence de (4 et 6) g NaCl·L⁻¹, les cals ont présenté un taux de croissance supé-

rieur à 50 % de celui du témoin. En outre, les cals soumis au stress salin ont généralement présenté une certaine déshydratation [rapport (matière sèche / matière fraîche) augmenté de 1,65 fois par rapport au témoin].

L'analyse de la variance a montré un effet très hautement significatif de la concentration en NaCl sur la masse de la matière sèche des cals (*tableau I*). Le test de Duncan a permis de distinguer trois groupes différents parmi les concentrations de NaCl testées, sur la base de la masse de matière des cals qui a décru en fonctions des taux de 0 mg NaCl·L⁻¹, (4 et 6) mg NaCl·L⁻¹ et (8 et 9) mg NaCl·L⁻¹. Toutefois, le classement sur la base du taux de croissance a diminué en fonction de quatre groupes distincts correspondant aux concentrations 0 mg NaCl·L⁻¹, (4 et 6) mg NaCl·L⁻¹, 8 mg NaCl·L⁻¹ et 9 mg NaCl·L⁻¹.

3.2. Sélection de cals en condition de stress salin progressif

La sélection *in vitro* de la tolérance à la salinité au niveau des cals a consisté à rechercher et isoler des amas cellulaires capables de croître sur un milieu de culture en présence de concentrations croissantes en sel (NaCl).

Tableau I.

Détermination de la concentration saline permettant de sélectionner des cals du citrange Troyer tolérants au sel (NaCl) : analyse de la variance pour la masse de matière sèche des cals et pour le taux d'accroissement de la matière sèche.

Variable considérée	Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts (× 10 ⁻⁶)	Carrés moyens (× 10 ⁻⁶)	F observé
Matière sèche	Durée	1	13,21	132,1	1,53 ns
	Salinité	4	2 834,46	708,61	82,31 ***
	Interaction	4	35,95	8,99	1,04 ns
	Erreur résiduelle	110	947,03	8,61	–
	Total	119	3 830,65	–	–
Taux d'accroissement de la matière sèche	Durée	1	13 435,44	13 435,44	2,18 ns
	Salinité	4	2 373 260,66	593 315,16	96,26 ***
	Interaction	4	26 230,19	6 557,55	1,06 ns
	Erreur résiduelle	110	678 019,70	6 163,82	–
	Total	119	3 090 945,98	–	–

ns : Effet non significatif.

*** Effet significatif à 1 %.

Tableau II.

Masse et taux d'accroissement des matières fraîche et sèche en fin d'expérimentation pour différents types de cals de citrange Troyer soumis à un stress progressif provoqué par des excès de NaCl dans le milieu de culture.

Type de cals	Masse (g)		Taux d'accroissement (%)	
	Matière fraîche	Matière sèche	Matière fraîche	Matière sèche
Témoin	0,86 ± 0,11 a	0,08 ± 0,01 a	3,30 ± 0,56 a	5,30 ± 0,65 a
Tolérant	0,57 ± 0,08 b	0,06 ± 0,01 b	1,87 ± 0,42 b	3,66 ± 0,83 b
Sensible	0,29 ± 0,01 c	0,03 ± 0,01 c	0,43 ± 0,03 c	1,38 ± 0,24 c

Dans chaque colonne, les valeurs affectées par des lettres différentes diffèrent au seuil de 5 %.

La culture de 1400 cals pendant 1 mois de stress en présence de 4 g NaCl·L⁻¹ a entraîné le ralentissement de leur croissance à l'exception de 57 fragments qui ont présenté une taille comparable à celle des témoins. Après transfert de tous les cals sur le deuxième milieu à 6 g·L⁻¹ NaCl, 38 autres fragments jaune clair ont montré une croissance remarquablement semblable à celle des premiers cals sélectionnés. En revanche, les autres fragments ont eu une croissance inhibée et se sont légèrement colorés en brun. Le transfert de la totalité des cals en présence d'une pression sélective de 8 g·L⁻¹ NaCl (stress final) a accentué le brunissement de la quasi-totalité des cals à croissance inhibée (cals sensibles). En revanche, les 57 fragments isolés sur milieu en présence de 4 g NaCl·L⁻¹ et les 38 cals repérés sur le milieu à 6 g NaCl·L⁻¹ ont manifesté également leur tolérance à 8 g NaCl·L⁻¹ et ils ont continué à croître en conservant la couleur jaune clair et l'aspect friable (cals tolérants).

Les masses de matières fraîche et sèche mesurées à la fin de l'expérimentation ont diminué sous l'action du NaCl et le taux de croissance a été plus affecté pour les cals sensibles que pour les cals tolérants ou témoins (*tableau II*). En effet, le taux de croissance relative de la masse de matière sèche mesuré pour les cals sensibles a été de 26,01 %, alors qu'il a été de 69,01 % pour les cals tolérants.

L'analyse de variance effectuée pour les paramètres de croissances mesurés a révélé une différence très hautement significative pour le facteur type de cals. Le test Duncan

Tableau III.

Masse et taux d'accroissement de la matière fraîche permettant de tester l'indépendance de différents types de cals de citrange Troyer vis-à-vis du sel NaCl, mesurés après 2 mois de culture sur milieu de culture dépourvu de NaCl.

Type de cals	Matière fraîche (g)	Taux d'accroissement moyen
Témoin	4,55 ± 1,12 a	4,30 ± 1,30 b
Tolérant	4,63 ± 1,22 a	7,07 ± 2,13 a
Sensible	0,33 ± 0,05 b	0,15 ± 0,08 c

Dans chaque colonne, les valeurs affectées par des lettres différentes diffèrent au seuil de 5 %.

a distingué trois groupes différents (croissance des cals témoins supérieure à celle des cals tolérants, elle-même supérieure à celle des cals sensibles) (*tableau II*). Cependant, le taux de croissance des cals sélectionnés, inférieur de moins de 50 % à celui des cals témoins, atteste de leur caractère de tolérance vis-à-vis du stress salin.

3.3. Indépendance et stabilité des lignées cellulaires sélectionnées

Après repiquage de l'ensemble des cals sur le milieu de callogenèse sans NaCl (contrôle d'indépendance), les cals sélectionnés précédemment ont montré une croissance sensiblement égale à celle des cals témoins (*tableau III*), démontrant ainsi leur indépendance vis-à-vis du NaCl. En effet, la masse de matière fraîche de ces cals tolérants,

Tableau IV.

Masse et taux d'accroissement de la matière fraîche permettant de tester la stabilité de la tolérance de différents types de cals de citrange Troyer vis-à-vis du sel NaCl, mesurés après (1 et 2) mois de culture sur milieu de culture avec 8 g NaCl·L⁻¹.

Type de cals	Matière fraîche (g)		Taux d'accroissement	
	1 mois	2 mois	1 mois	2 mois
Témoin	6,12 ± 1,03 a	8,63 ± 1,72 a	0,34 ± 0,15 a	0,94 ± 0,33 a
Tolérants	6,11 ± 1,06 a	8,02 ± 1,03 a	0,32 ± 0,13 a	0,84 ± 0,39 a
Sensibles	0,37 ± 0,04 b	0,39 ± 0,04 b	0,13 ± 0,06 b	0,19 ± 0,07 b

Dans chaque colonne, les valeurs affectées par des lettres différentes diffèrent au seuil de 5 %.

exprimée en pourcentage du témoin, a été de 101,6 % à la fin du test d'indépendance. En revanche, les cals sensibles ont peu augmenté et leur masse de matière fraîche a été très faible (7,2 % du témoin).

L'analyse statistique effectuée pour la variable masse de matière fraîche des cals mesurée à la fin du test d'indépendance a montré un effet très hautement significatif du facteur « type de cals ». Le test de Duncan a distingué deux groupes distincts parmi les cals : les cals témoins ou tolérants dans un groupe et les cals sensibles dans l'autre groupe (*tableau III*) ; cela confirme que la croissance des cals tolérants est indépendante de la présence de NaCl dans le milieu de culture. Cependant, le classement sur la base du taux de croissance de la masse de matière fraîche a distingué trois groupes distincts révélant ainsi une performance meilleure des cals tolérants par rapport aux cals témoins (*tableau III*).

Après remise en culture en présence d'une pression saline sélective de 8 g NaCl·L⁻¹ (contrôle de stabilité), les cals tolérants ont conservé leur couleur jaune clair et maintenu une croissance comparable à celle des témoins (*tableau IV*). En revanche, les cals sensibles n'ont pas évolué ou se sont nécrosés. L'analyse de variance montre un effet très hautement significatif des facteurs type de cals et durée de culture (*tableau V*). À (1 et 2) mois de culture des cals dans un milieu avec 8 g NaCl·L⁻¹, le test de Duncan a distingué deux groupes distincts parmi les types de cals : les témoins et les tolérants dans un même groupe, les sensibles dans un autre (*tableau IV*) ; cela

prouve que la croissance des cals tolérants varie très peu en présence de NaCl.

3.4. Teneurs en ions K⁺, Na⁺, en proline et en sucres solubles des cals

La teneur en potassium des cals témoin et des cals tolérants été voisine, celle des cals sensibles s'est révélée plus faible. La teneur en sodium a été beaucoup plus élevée dans les cals tolérants et sensibles que dans les cals témoins (*tableau VI*). Le rapport [K⁺ / Na⁺] a diminué dans tous les cals cultivés en présence de NaCl, mais il a été relativement plus faible dans les cals sensibles (rapport de 0,09) que dans les cals tolérants (rapport de 0,18). Si l'on s'intéresse aux solutés organiques analysés, la salinité du milieu de culture a entraîné l'accumulation de proline et de sucres solubles dans les cals tolérants, alors que les cals sensibles ne présentaient pas de différence avec le témoin (*tableau VI*).

L'analyse de variance a montré un effet très hautement significatif du type de cal (*tableau VII*) vis-à-vis des quatre variables analysées (K⁺, Na⁺, proline et sucres solubles). Le test de Duncan a distingué deux groupes pour K⁺ (cals témoins et tolérants dans un groupe, cals sensibles dans l'autre), ainsi que pour la proline et les sucres (cals tolérants dans un groupe, cals témoins et sensibles dans l'autre) et trois groupes pour Na⁺ (cals témoins, cals tolérants et cals sensibles l'autre).

Tableau V.

Analyse de variance pour la masse et le taux d'accroissement de la matière fraîche permettant de tester la stabilité de la tolérance de différents types de cals de citrange Troyer vis-à-vis du sel NaCl, mesurés sur milieu de culture avec 8 g NaCl·L⁻¹.

Variable considérée	Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts (× 10 ⁻⁶)	Carrés moyens (× 10 ⁻⁶)	F observé
Matière fraîche	Durée	1	840 326,64	840 326,64	75.51 ***
	Type de cal	3	51 518 614,48	17 172 871,49	1 543.07 ***
	Interaction	3	268 479,52	89 493,17	8.04 ***
	Erreur résiduelle	88	979 355,62	11 129,04	–
	Total	95	53 606 776,26	–	–
Taux d'accroissement de la matière fraîche	Durée	1	542 189,68	542 189,68	50.23 ***
	Type de cal	3	598 065,06	199 355,02	18.47 ***
	Interaction	3	120 773,93	40 257,98	3.73 *
	Erreur résiduelle	88	949 888,55	10 794,19	–
	Total	95	2 210 917,23	–	–

* Effet significatif à 5 %.

*** Effet significatif à 1 %.

Tableau VI.

Teneurs des cals en ions potassium et sodium et en proline et sucres solubles, mesurées en fin d'expérimentation pour différents types de cals de citrange Troyer soumis à un stress progressif provoqué par des excès de NaCl dans le milieu de culture.

Type de cal	K ⁺ (μEq·g matière sèche)	Na ⁺ (μEq·g matière sèche)	Proline (μmol·g matière fraîche)	Sucres (μmol·g matière fraîche)
Témoin	157,79 ± 4,02 a	87,94 ± 5,89 c	21,45 ± 2,43 b	16,96 ± 1,19 b
Tolérant	150,6 ± 2,56 a	822,5 ± 58,58 b	56,73 ± 7,11 a	25,93 ± 1,86 a
Sensible	78,59 ± 3,46 b	912,6 ± 45,54 a	21,55 ± 0,82 b	16,16 ± 0,82 b

Dans chaque colonne, les valeurs affectées par des lettres différentes diffèrent au seuil de 5 %.

Par ailleurs, la croissance des cals tous types confondus a été fortement et positivement corrélée avec leur teneur en K⁺. En revanche, la corrélation a été négative, d'une part entre la masse de matière et la teneur en ions Na⁺ et d'autre part entre cette teneur en ions Na⁺ et la teneur en ions K⁺. Par ailleurs, la proline et les sucres solubles sont apparus non corrélés aux autres paramètres mesurés (tableau VIII). Cependant, pour les cals tolérants, l'analyse des corrélations a révélé que la masse de matière était très fortement corrélée aussi bien avec la teneur en ions miné-

raux qu'avec celle des composés organiques. Les solutés minéraux et organiques se sont montrés en outre tous corrélés les uns aux autres chez ces cals.

4. Discussion

Les graines du porte-greffe hybride citrange Troyer sont hautement polyembryonnées et comportent donc un embryon zygotique et plusieurs embryons nucellaires. Ce facteur

Tableau VII.

Analyse de la variance pour les teneurs des cals en ions potassium et sodium et en proline et sucres solubles, mesurées en fin d'expérimentation pour différents types de cals de citrange Troyer soumis à un stress progressif provoqué par des excès de NaCl dans le milieu de culture.

Variable considérée	Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts ($\times 10^{-6}$)	Carrés moyens ($\times 10^{-6}$)	F observé
K ⁺	Type de cal	2	1 194 911,83	597 455,92	623,92 ***
	Erreur résiduelle	9	8 618,33	957,59	–
	Total	11	1 203 530,16	–	–
Na ⁺	Type de cal	2	13 857 711,79	6 928 855,90	1 737,31 ***
	Erreur résiduelle	9	35 894,45	3 988,27	–
	Total	11	13 893 606,24	–	–
Proline	Type de cal	2	2 353 548,30	1 176 774,15	131,04 ***
	Erreur résiduelle	9	80 820,82	8 980,09	–
	Total	11	2 434 369,13	–	–
Sucres	Type de cal	2	490 607,88	245 303,94	65,85 ***
	Erreur résiduelle	9	33 528,12	3 725,35	–
	Total	11	524 136,00	–	–

*** Effet significatif à 1 %.

Tableau VIII.

Matrice des corrélations entre la masse de matière fraîche des cals et leurs teneurs en ions potassium et sodium et en proline et sucres solubles, mesurées en fin d'expérimentation pour différents types de cals de citrange Troyer soumis à un stress progressif provoqué par des excès de NaCl dans le milieu de culture.

Type de cal	Variable	K ⁺	Na ⁺	Proline	Sucres
Tous types confondus	Masse de matière	0,98581	-0,66849	0,36472	0,43357
		0,0001	0,0175	0,2438	0,1591
	K ⁺	1	-0,64628	0,41796	0,48623
		0	0,0232	0,1764	0,1090
	Na ⁺	-0,66849	1	0,40782	0,33994
		0,0157	0,0	0,1882	0,2796
Tolérant	Masse de matière	0,99453	0,99409	0,99565	0,99200
		0,0055	0,0059	0,0043	0,0080
	K ⁺	1	0,98954	0,99634	0,97366
		0	0,0105	0,0037	0,0263
	Na ⁺	0,98954	1,00000	0,98244	0,98233
		0,0105	0,0	0,0176	0,0177
Proline	0,99634	0,98244	1,00000	0,98226	
	0,0037	0,0176	0,0	0,0177	
Sensible	K ⁺	1	-0,93330	0,59095	0,20541
		0	0,0667	0,4090	0,7946
	Na ⁺	-0,93330	1	0,39868	0,14919
		0,0667	0	0,6013	0,8508

intrinsèque de forte hétérogénéité génétique des explants de départ peut laisser prévoir une grande variabilité de la réponse *in vitro* des embryons excisés.

Globalement, le stress salin a entraîné une réduction de croissance, ainsi que le brunissement et la nécrose des amas cellulaires. Le pourcentage de réduction de la masse de matière sèche, généralement considéré comme indice de sensibilité vis-à-vis du stress, a montré que les concentrations de (4 et 6) g NaCl·L⁻¹ étaient insuffisantes pour causer une réduction relative de matière de 50 % par rapport aux témoins (seuil très utilisé pour le classement de la tolérance des plantes). En revanche, les concentrations (8 et 9) g NaCl·L⁻¹ appliquées pendant (1 ou 2) mois de culture pourraient être utilisées pour le criblage des amas cellulaires tolérants, puisqu'elles ont entraîné des réductions plus marquées. Ces résultats permettent de fixer la dose saline sélective à 8 g NaCl·L⁻¹ à laquelle doit survivre les cellules tolérantes.

En effet, lors de l'application du stress salin progressif, quelques cals ont manifesté une certaine tolérance (absence de brunissement et maintien d'une croissance continue) vis-à-vis du NaCl. Ces cals tolérants, isolés en conditions sélectives (forte teneur en NaCl), ont représenté un pourcentage cumulatif de 6,8 % des 1400 fragments initiaux. Ce pourcentage assez élevé pourrait être dû à l'existence du caractère de tolérance dans certains explants embryonnaires de départ (hétérogénéité génétique), ainsi qu'à une variation des amas cellulaires cultivés *in vitro* qui résulterait de l'utilisation des phytorégulateurs à des concentrations élevées [(1 mg 2,4-D·L⁻¹ et 5 mg BAP·L⁻¹) pendant une longue durée de culture. En outre, le fait que la tolérance se soit manifestée dans une partie des fragments de cals et, parfois, dans des sous populations cellulaires provenant du même explant de départ suggérerait que le potentiel d'adaptation préexiste au processus de sélection en présence de NaCl et que l'agent « stressant » permet le criblage de cellules tolérantes. Cependant, le pourcentage des cals tolérants sélectionnés a été très élevé en regard d'une hypothèse de mutation – la tolérance étant un caractère polygénique [3] – ce qui pourrait suggérer un changement épigénétique, plus fréquent mais non permanent et beau-

coup moins stable que les mutations [18], voire une acclimatation des cals suite notamment à l'application d'une pression sélective graduelle. En effet, Winicov [19] rapporte que les cellules tolérantes sont sélectionnées à des fréquences de mutation à partir de cellules sensibles à la salinité. Cette fréquence de la variation en culture cellulaire est généralement de 10⁻⁵ à 10⁻⁸ en l'absence d'agent mutagène et peut atteindre 10⁻³ à la suite d'une mutagenèse ; cependant, la mutation est une base improbable de la modification quand une trop grande proportion (plus de 1 %) des cellules répondent positivement à la sélection [20].

Le maintien de la croissance, en l'absence de stress salin (test d'indépendance), des cals sélectionnés démontre leur indépendance vis-à-vis de NaCl. En outre, le maintien de cette tolérance (test de stabilité en présence 8 g NaCl·L⁻¹) après un passage de 2 mois sur le milieu sans NaCl, indique une certaine stabilité du caractère de tolérance/résistance et confirme la sélection de variants tolérant la salinité.

Par ailleurs, l'analyse minérale a montré que la culture des cals en présence de NaCl a provoqué une accumulation importante d'ions sodium dont l'effet toxique chez les cals non sélectionnés s'est traduit par une réduction de la croissance et la nécrose des cellules sensibles. Elle a montré également que la teneur en ions K⁺ des cals tolérants du citrange Troyer ne différait pas significativement de celle des cals témoins. En revanche, la diminution de cette teneur dans les cals non sélectionnés concorde avec les données de la littérature et témoigne de la sensibilité des glycophytes soumis au stress salin [10]. En effet, Rochdi *et al.* [21] avaient déjà signalé, chez le citrange Troyer, la diminution des teneurs en ions K⁺ dans les cals sensibles au stress salin. Ces chercheurs considéraient la baisse de la teneur en potassium comme un critère de sensibilité au NaCl. Cramer *et al.* [22], quant à eux, ont noté que les concentrations élevées en Na⁺ provoquaient le déplacement de Ca²⁺ à partir du plasmalemme résultant en une perturbation de la perméabilité membranaire et en l'efflux de K⁺ à partir du cytosol. Or, le maintien d'une concentration suffisante en potassium serait indispensable pour la croissance [23].

La tolérance des cellules à NaCl pourrait être corrélée avec des changements dans les propriétés de transport et dans la capacité de régulation ionique. Nos résultats indiqueraient aussi qu'il existe une relation étroite entre la croissance des cals et leur teneur en K^+ et que la tolérance des cals sélectionnés est associée à la rétention de K^+ . D'autres études ont également montré que la quantité de biomasse produite était liée à l'efficacité d'absorption des ions potassium [24] et que la tolérance des cals des agrumes était en relation avec la rétention de K^+ [11, 12]. Cependant, en présence de NaCl, Ben-Hayyim et Kochba [9] ont enregistré une plus faible teneur en potassium dans les cals tolérants que dans les cals sensibles de *Citrus sinensis*. Pour ces mêmes chercheurs, il n'est pas apparu de corrélation directe entre la tolérance et la concentration interne en K^+ .

Le rapport K^+ / Na^+ , plus faible dans les cals sensibles, suggère que les cals tolérants présentent une meilleure sélectivité et une capacité supérieure d'absorption de K^+ . D'autres auteurs ont aussi noté une diminution notable de ce rapport chez des cultures sensibles [21, 25]. Le rapport K^+ / Na^+ reste toutefois inférieur à celui des témoins cultivés en l'absence de NaCl, car la teneur en ions Na^+ (le dénominateur) a augmenté chez les cals sensibles ainsi que chez les cals tolérants lesquels gardent une bonne croissance. D'autres études ont noté que l'accumulation de sodium, sous les conditions salines, peut être une valeur adaptative [26]. Nos résultats montrent aussi que la croissance des cals tolérants est fortement corrélée à leur teneur en sodium. Cela démontre que Na^+ s'accumule à deux niveaux cellulaires : accumulation dans le cytosol (effet toxique) chez les cellules sensibles ou compartimentage vacuolaire pour les cals tolérants. Cette séquestration vacuolaire des ions sodium estompé l'effet toxique de Na^+ tout en augmentant le rapport K^+ / Na^+ cytoplasmique et en assurant le maintien de l'équilibre hydrique des cals sélectionnés à travers l'augmentation de la pression osmotique des cellules tolérantes. Certains chercheurs ont aussi noté une accumulation des ions salins dans les cellules tolérantes [8] et certains autres travaux ont montré l'implication du compartimentage

ionique chez des glycophytes, comme moyen de tolérance à la salinité [27]. Maathuis et Amtmann [28] quant à eux précisent que l'élément clef dans la tolérance à la salinité est la capacité de maintenir un haut rapport K^+ / Na^+ cytosolique.

L'accumulation du sodium est en outre fortement corrélée à l'augmentation de la teneur en proline et en sucres solubles des cals tolérants de citrange Troyer. D'autres chercheurs ont aussi enregistré l'augmentation de la teneur en proline et en sucres chez des cals tolérants au stress salin [29–31]. Or, en s'accumulant dans le cytosol, les solutés organiques assureraient l'ajustement osmotique entre celui-ci et la vacuole, lieu de séquestration des ions salins. L'accumulation de ces solutés organiques constitue donc un caractère métabolique à valeur adaptative qui pourrait être un indicateur de tolérance au stress salin des cals du citrange Troyer. En revanche, les cals sensibles n'ont montré aucune variation de la teneur de ces solutés. Ce résultat concorde avec celui de Rochdi *et al.* [21] qui ont noté l'égalité des teneurs en proline et en sucres solubles entre les cals témoins et les cals stressés sensibles chez le citrange Troyer. Or, la stabilité des teneurs en solutés organiques, associée aux teneurs élevées en sodium enregistrées dans les cals non sélectionnés de ce porte-greffe, dues à une incapacité de restreindre l'absorption de ces ions (conjointement au brunissement, à la réduction de la croissance et à la diminution de la teneur en potassium), confirme que ces cals sensibles sont incapables de séquestrer les ions salins dans les vacuoles, ce qui se traduirait par la sensibilité au sel du citrange.

Par ailleurs, la forte corrélation enregistrée dans notre étude entre les teneurs en proline et en glucides chez les cals tolérants du citrange Troyer s'expliquerait par l'hypothèse de Stewart [32] qui suggère que les teneurs élevées en sucres solubles peuvent induire l'accumulation de la proline puisqu'elles inhibent l'oxydation de cet acide aminé. En effet, chez plusieurs espèces en conditions de stress hydrique, l'accumulation de la proline n'a lieu que si suffisamment d'hydrates de carbone sont présents dans les tissus [33].

5. Conclusions

Des lignées cellulaires tolérantes à la contrainte saline ont été développées à partir d'embryons du porte-greffe citrange Troyer par application de concentrations croissantes en sel [(4 à 8) g NaCl·L⁻¹] dans le milieu de culture. À 8 g NaCl·L⁻¹, les cals tolérants ont eu une croissance comparable à celle des témoins et leur transfert sur un milieu nutritif sans NaCl a permis de constater leur indépendance vis-à-vis du sel. Leur remise en présence d'une pression de sélection à 8 g NaCl·L⁻¹ a confirmé la stabilité de leur caractère de tolérance à la salinité. La teneur en ion K⁺ des cals tolérants s'est révélée corrélée à la croissance et elle n'a pas été affectée par la salinité. En revanche, la teneur en Na⁺ a augmenté chez tous les cals cultivés en présence de 8 g NaCl·L⁻¹, ce qui impliquerait un compartimentage vacuolaire chez les cals tolérants sélectionnés. Le caractère de tolérance de ces derniers cals pourrait être corrélé avec des changements dans les propriétés de transport des ions et dans la capacité de régulation et de compartimentage ioniques. La séquestration de Na⁺, « comportement halophytique », serait supportée et contrebalancée par une augmentation importante de la teneur en proline et en sucres solubles. Cette accumulation de solutés organiques pourrait être un caractère métabolique à valeur adaptative, qui permet un ajustement osmotique entre le compartiment vacuolaire et le cytosol des cellules des cals tolérants.

Remerciements

Ce travail a été réalisé avec l'appui du projet PROTARS n° P5T1/10 financé par le ministère marocain de l'Enseignement supérieur, de la Recherche scientifique et de la Formation des cadres.

Références

- [1] Furr J.R., Ream C.L., Breeding and testing rootstocks for salt tolerance, in: Chapman H. (Ed.), Proc. First Int. Citrus Symp., Vol. 1, Univ. California, Riverside, USA, 1969, pp. 373–380.
- [2] Syvertsen J.P., Yelenosky G., Salinity can enhance freeze tolerance of *Citrus* rootstock seedling by modifying growth, water relations, and mineral nutrition, J. Am. Soc. Hortic. Sci. 113 (1988) 889–893.
- [3] Sykes S.R., The inheritance of salt exclusion in woody perennial fruit species, Plant Soil 146 (1992) 123–129.
- [4] Rains D.W., Developing salt tolerance, California Agriculture, Special issue: Genetic engineering of plants, 36 (1982) 30–51.
- [5] Beloualy N., Bouharmont J., NaCl-tolerant plant of *Poncirus trifoliata* regenerated from tolerant cell lines, Theor. Appl. Genet. 83 (1992) 509–514.
- [6] Haouala F., Hannachi C., Zid E., Exploitation de la variabilité somaclonale pour la recherche d'œilletons tolérants à la salinité, Tropicultura 21 (2003) 16–21.
- [7] Stavarek S.J., Rains D.W., The development of tolerance to mineral stress, HortScience 19 (1984) 377–382.
- [8] Watad A.A., Reinhold L., Lerner H., Comparison between a stable NaCl-selected *Nicotiana* cell line and the wild type, Plant Physiol. 73 (1983) 624–629.
- [9] Ben-Hayyim G., Kochba J., Aspect of salt tolerance in a NaCl-selected stable cell line of *Citrus sinensis*, Plant Physiol. 72 (1983) 685–690.
- [10] Ben Hayyim G., Spiegel-Roy P., Neumann H., Relation between ion accumulation of salt-sensitive and isolated stable salt-tolerant cell lines of *Citrus aurantium*, Plant Physiol. 78 (1985) 144–148.
- [11] Bouharmont J., Beloualy N., Van-Sint-Jan V., Improvement of salt tolerance by *in vitro* selection at the cellular level, in: Lieth H., Al Masoom A.A. (Eds.), Towards the rational use of high salinity tolerant plants, Proc. ASWAS Conf, 8–15 December, 1990, Al Ain, United Arab Emirates, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands, 1993, pp. 83–88.
- [12] Piqueras A., Hernandez J.A., Olmos E., Hellin E., Sevilla F., Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of *Citrus* cells to salt stress, Plant Cell Tiss. Org. 45 (1996) 53–60.
- [13] Ben-Hayyim G., Kafkafi U., Ganmore-Neumann R., Role of internal potassium in maintaining growth of cultured *Citrus* cells on increasing NaCl and CaCl₂ concentrations, Plant Physiol. 85 (1987) 434–439.

- [14] Murashige T., Tucker D.P.H., Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture, in: Chapman H. (Ed.), Proc. First Int. Citrus Symp., Vol. 3, Univ. California, Riverside, USA, 1969, pp. 1155–1161.
- [15] Dreier W., Goring M., Der einfluss hoher Salzkonzentrationen auf verschieden physiologische Parameter von Maiswurzeln, *Win Z. der Hu Berlin, Nath. Naturwiss. R.* 23 (1974) 641–644.
- [16] Ashwell G., Colorimetric analysis of sugars, in: Golowick S.P., Kaplan N.O. (Eds.), *Methods in enzymology*, VIII, Acad. Press Inc. Publ., New York, USA, 1957, pp. 84–85.
- [17] Novozamsky I., Houba V.J.G., van der Lee J.J., van Eck R., Mignorance M.D., A convenient wet digestion procedure for multi-element analysis of plant materials, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 24 (19–20) (1993) 2595–2605.
- [18] Meins R., Heritable variation in plant cell culture, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 34 (1983) 27–46.
- [19] Winicov I., New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants, *Ann. Bot.* 82 (1998) 703–710.
- [20] Maliga P., Isolation and characterization of mutants in plant cell culture, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35 (1984) 519–542.
- [21] Rochdi A., El Yacoubi H., Rachidai A., Comportement vis-à-vis de la salinité des cals des porte-greffes d'agrumes *Citrus aurantium*, citrange Troyer et *Poncirus trifoliata*, évaluation de critères certifiant la réponse des agrumes au stress salin, *Agronomie* 23 (2003) 643–649.
- [22] Cramer G.R., Lauchli A., Polito V.S., Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiol.* 79 (1985) 207–211.
- [23] Marshner H., Mineral nutrition of higher plants, Acad. Press, London, UK, 1995.
- [24] Piri K., Anceau C., El Jaafari S., Lepoivre P., Semal J., Sélection *in vitro* de plantes androgénétiques de blé tendre résistantes à la salinité, in: Aupelf-Uref (Ed.), *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* John Libbey Eurotext, Paris, France, 1994, pp. 311–320.
- [25] Rachidai A., Driouich A., Ouassou A., Ismaili M., Interaction entre K^{+} et Na^{+} en conditions de stress salin chez deux variétés à résistances différentes de blé dur (*T. durum*), *Rev. Rés. Amélior. Prod. Agric. Milieu Aride* 6 (1994) 229–239.
- [26] Erdei L., Kuiper P.J.C., The effect of salinity on growth cation content, Na^{+} -uptake and translocation in salt-sensitive and salt-tolerant *Plantago* spp., *Physiol. Plantarum* 47 (1979) 95–99.
- [27] Binzel M.L., Hess F.D., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells, *Plant Physiol.* 86 (1988) 607–614.
- [28] Maathuis F.J.M., Amtmann A., K^{+} nutrition and Na^{+} toxicity, the basis of cellular K/Na ratios, *Ann. Bot.* 84 (1999) 123–133.
- [29] Liu T., Van Staden J., Selection and characterization of sodium chloride-tolerant callus of *Glycine max* (L.) Merr. cv. Acme, *Plant Growth Regul.* 31 (1999) 195–207.
- [30] Patnaik J., Debata B.K., *In vitro* selection of NaCl tolerant callus lines of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats., *Plant Sci.* 124 (1997) 203–210.
- [31] Elavumoottil O.C., Martin J.P., Moreno M.L., Changes in sugars, sucrose synthase activity and proteins in salinity tolerant callus and cell suspension cultures of *Brassica oleracea* L., *Biol. Plantarum* 46 (2003) 7–12.
- [32] Stewart C.R., Proline accumulation: Biochemical aspect, in: Paleg L.G., Aspinall D. (Eds.), *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*, Acad. Press, New York, USA, 1981, pp. 243–259.
- [33] Hsiao T.C., Plant responses to water stress, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 24 (1973) 519–570.

Selección y evaluación de linajes de callos estables y tolerantes al estrés salino en el citrange 'Troyer' [*Citrus sinensis* (L.) × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.].

Resumen — Introducción. Los cítricos son sensibles a la salinidad. Nuestro estudio tenía como objetivos la selección, en el citrange Troyer, de linajes celulares tolerantes al NaCl, la evaluación del efecto de la sal en el crecimiento de los callos y dosificar los solutos que pueden estar implicados en su respuesta al estrés salino. **Material y métodos.** Se cultivaron callos en un medio de cultivo en el que la concentración de NaCl se incrementó progresivamente hasta llegar a 8 g NaCl·L⁻¹. Posteriormente, se trasladaron a un medio sin NaCl para probar su independencia con respecto a la sal para, luego, volver a ponerlos en 8 g NaCl·L⁻¹ para probar su estabilidad. Al final del experimento, se efectuaron dosificaciones de los solutos (Na⁺, K⁺, prolina y azúcares solubles) contenidos en los callos. **Resultados y discusión.** La salinidad retrasó el crecimiento y causó el pardeamiento de la mayoría de explantes (callos sensibles). Los callos tolerantes presentaron un crecimiento comparable al de los testigos. El traslado de estos callos a un medio sin NaCl y su nueva puesta en cultivo en un medio salino demostró la independencia y la estabilidad del carácter de tolerancia seleccionado. El contenido de K⁺ de los callos tolerantes fue próximo al de los testigos, pero menor que el de los callos sensibles. En cambio, el contenido de iones Na⁺ de los callos tolerantes y sensibles fue relativamente más elevado que el de los testigos. Esto significaría que el sodio se acumula en dos niveles celulares según el tipo de callo: invasión del hialoplasma (efecto tóxico) en callos sensibles o compartimentación vacuolar en callos tolerantes. La salinidad provocó la acumulación de prolina y azúcares solubles en los callos tolerantes pero no en los callos sensibles. **Conclusiones.** Se obtuvieron linajes celulares estables y tolerantes al NaCl a partir de embriones de citrange Troyer. Esta tolerancia podría estar relacionada con cambios en las propiedades de transporte de los iones y en la capacidad de regulación y compartimentación iónica. La acumulación de solutos orgánicos constituye un carácter metabólico de valor adaptativo que podría constituir un indicador de tolerancia al estrés salino de los callos.

Marruecos / *Citrus* / citranjo / cultivo *in vitro* / callogénesis / tolerancia a la sal