



Research

open access

## La régénération et l'assainissement viral des agrumes en Tunisie par la technique du microgreffage des méristèmes «in vitro»

N. METOUI<sup>1</sup>,  
L. HAMROUNI<sup>2\*</sup>,  
W. BEN HBAL<sup>3</sup>,  
F. DHAUDI<sup>1</sup>,  
R. BEN BRAHEM<sup>4</sup>  
T. BETAEIB<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Centre Technique des Agrumes (CTA),  
B.P.N°318, Zaoulett Jedidi 8099 - Tunisie

<sup>2\*</sup> Laboratoire d'Ecologie Forestière, Institut  
National de Recherches en Génie Rural, Eaux et  
Forêts. BP 10, 2080 Ariana, Tunisia.

<sup>3</sup> Institut National d'Agronomie de Tunis, 43,  
Avenue Charles Nicolle 1082 -Tunis Mahrajène  
- Tunisie

<sup>4</sup> École supérieure des industries alimentaires de  
Tunis ESIAT, 43 Rue Charles Nicole -1082 Cité  
Mahrajène Le Belvédère Tunis-Tunisie.

\*Corresponding author: hamrounilam@yahoo.fr

**Abstract** - The micrografting is one of the techniques of vegetative propagation allowing getting authentic and virus free citrus. This technique is one of methods widely used in the scheme of certification of different country producing citrus. It allows getting of clonal buds or what we are calling pre basic material which serves in producing citrus certified "viruses Free". Some trials have been established to improve the preservation of fruits and seeds of rootstock *Citrangue troyer* used in vitro as well as the success rate and development of plugins. Indeed, tests of fungal treatment for three months have shown that the use of the fungicide "Triziman" is the most effective way with its highest protective effect, which has a lower percentage of infection (56%) compared to Methyl tiphanate and Benlate (respectively 75.7% 70.4%). Thus, and after five months of follow-up testing, we have shown that the nature and the tool of the average retention significantly affect seed germination percentage. Indeed, the seeds collected directly from fruits freshly harvested *Citrangue troyer* ensure a higher percentage of germination of up to 100% compared to seeds treated and stored at 4°C with a germination rate does not exceed 29% and in some cases it decreases to 0%. Tests conducted on the effect of the variety on the success rate of tip grafting showed that the percentage obtained varies from one variety to another. Indeed, the *Clémentinier arbi* shows the percentage of success with the highest (19%), while the success rate is 13% for the *Maltese* and 9% for *Clémentinier Cassar*.

**Keywords :** *Citrangue troyer*, tip grafting, *Citronnier arbi*, *Maltese*, *Clémentinier Cassar*.

**Résumé** - Le microgreffage est une technique de multiplication végétative qui permet l'obtention de plants d'agrumes authentiques et sains. Cette technique est l'une des méthodes les plus utilisées dans les schémas de certification de différents pays producteurs d'agrumes. Elle permet l'obtention de têtes de clones ou ce qu'on appelle le matériel de pré base qui servira à son tour à produire des plants d'agrumes certifiés indemnes de maladies virales. Des essais ont été mis en place afin d'améliorer la conservation des fruits et des pépins du porte greffe *Citrangue troyer* utilisé in vitro ainsi que le taux de réussite et le développement du greffons. En effet, des essais de traitement fongiques durant trois mois ont montrés que l'utilisation du fongicide «Triziman» constitue le moyen le plus efficace grâce à son effet protecteur le plus élevé qui présente un pourcentage d'infection inférieur (56%) par rapport au Méthyl-tiphanate au Benlate (respectivement 75,7% 70,4%). Ainsi, et après cinq mois de suivi des essais, nous avons pu montrer que la nature et l'outil du moyen de conservation des pépins influent considérablement le pourcentage de germination. En effet, les pépins prélevés directement à partir des fruits de *Citrangue troyer* fraîchement récoltés assurent un pourcentage de germination plus élevé qui peut atteindre 100% par rapport aux pépins traités et conservés à 4°C dont le taux de germination ne dépasse pas 29% et dans certaine cas il décroît jusqu'au 0%. Les essais menés sur l'effet de la variété sur le taux de réussite du microgreffage d'apex ont montré que le pourcentage obtenu varie d'une variété à autre. En effet, le Citronnier arbi présente le pourcentage de réussite le plus élevé avec (19%) alors que le taux de réussite est de 13% pour la Maltaise demi-sanguine et de 9% pour le Clémentinier Cassar.

Concernant l'origine des pousses, les essais ont montré que le taux de réussite de microgreffage dépend aussi de l'origine des pousses utilisées. Les résultats montrent que le pourcentage de réussite est plus élevé pour les pousses prélevées directement à partir des pieds mères élevés sous insect-proof par rapport à ceux prélevées sur des baguettes forcées in vitro sous condition artificielles.

---

**Mots clés :** *Citrangue troyer*, microgreffage, Citronnier arbi, Maltaise demi sanguine, Clémentinier Cassar, apex.

---

## 1. INTRODUCTION

Les Agrumes représentent la production fruitière la plus importante du monde et sont classés parmi les fruits les plus cultivés en Tunisie car ils occupent une place importante dans la vie socio-économique (Lakhoua, 1997). En effet, cette culture généralement intensive vient au deuxième rang après les oliviers. Elle fait intervenir 11.600 producteurs et permet un revenu stable à plus de 25.000 familles en plus de la main d'œuvre saisonnière estimée à 3 millions de journées de travail/an. La superficie est passée de 13.500 en 1990 à 25.000 ha en 2014 grâce à la création de nouvelles plantations dans de nouvelles zones (Gifruit, 2014) Cette dernière superficie représente environ 5% des plantations arboricoles.

En dépit de la tradition tunisienne de produire les agrumes, le secteur agrumicole continue à affronter certains problèmes aussi bien à l'échelle de la production qu'à l'échelle de la commercialisation, en particulier au niveau du marché d'exportation. En dépit de sa spécialisation dans la production d'oranges Maltaises, la Tunisie a vu diminuer les exportations de cette variété durant les deux dernières décennies. Elles sont passées de 31 005 tonnes en 1997 à 20 530 tonnes en 2013. Cette diminution des exportations est principalement due à différents facteurs dont le vieillissement d'un pourcentage élevé de pieds d'agrumes (30 %) principalement dans la région du cap bon, le manque de maîtrise des techniques de tailles, de fertilisation et d'irrigation et surtout la difficulté de maîtrise de l'état sanitaire et des maladies des vergers. En effet, Cette culture est l'objet de problèmes phytosanitaires, essentiellement du fait des insectes, des acariens, des ravageurs, des champignons, des bactéries et principalement des maladies virales et à virus similaires qui n'ont aucune possibilité de lutte chimique. Ces derniers causent des pertes économiques énormes. Cette conjoncture et ces défaillances impose la nécessité de mener des recherches concernant l'amélioration du paquet technologique en vue d'augmenter les rendements d'une part, et de prospecter de nouveaux débouchés sur des marchés alternatifs d'autre part. Avant 1975, le nucellaire était la seule méthode pour enrayer les viroïdes des agrumes. Cependant, il y avait beaucoup de problèmes associés à la technologie nucellaire principalement l'apparition et la persistance des caractères juvéniles des plantules régénérées. Depuis, des études préliminaires ont montré que les petits apex méristématiques (de



0,1 à 0,25 mm de longueur) appartenant à des cultures maraîchères pouvaient être cultivés dans des milieux de culture artificiels à base de gélose. Les travaux de Morel et Morin (1952) ont permis d'obtenir des plants de Dahlia exempts de virus à partir de culture d'apex en conditions aseptiques. Grâce à cette méthode plusieurs espèces non ligneuses comme la pomme de terre et le fraisier ont pu être régénérées. Quant aux espèces ligneuses, elle n'était pas efficace car le taux de survie des rameaux était faible. Ce sont les travaux de Navarro et al (1975, 1981) qui ont permis la régénération des Citrus par microgreffage d'apex. Le microgreffage est une approche qui permet de résoudre bon nombre de problèmes classiques tels que les incompatibilités greffons/porte-greffes, la sécrétion de substances phénoliques et de résine (Joley et Opitz, 1971 ; AI-Barazi et Schwabe, 1982 ; Sheibani et Villiers, 1995), les reprises lentes et aléatoires des greffons, entraînant une hétérogénéité des arbres greffés surtout lorsqu'il s'agit des porte-greffes issus de semis. Le microgreffage permet également d'augmenter la production par : (i) la production de plantes indemnes de virus (Navarro et al., 1975 ; Mosella- Chancel, 1979 ; Vogel et al., 1988 ; Barba, et al., 1989 ; Ben Abdallah et al., 1996) ou (ii) pour la production de têtes de lignées ou de greffons sains utilisés pour la multiplication (Vogel et al., 1988). peut également être utilisé pour l'indexage (Bouزيد, 1983 ; Tanne et al., 1993) et le contrôle précoce des incompatibilités au greffage (Jonard et al., 1988). Au cours du présent travail nous nous sommes proposé de donner un aperçu sur l'application de cette technique en Tunisie, et les principaux résultats obtenus. De même, nous tenté d'améliorer les résultats jusqu'alors obtenus par des essais mis en place touchants les étapes les plus importante de cette technique.

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour les essais de micro-greffage des agrumes, est constitué du porte-greffe *Citrangé troyer* issus de semis *in vitro* et de trois variétés d'agrumes jugées très

importantes en Tunisie : Citronnier - Citronnier eurêka, Maltaise demi-sanguine, Clémentinier Cassar. Les explants des variétés testées sont représentés par des apex méristématiques prélevés à partir des pieds mères élevées sous serre insecte-proof ou bien à partir des baguettes forcées *in vitro* qui sont prélevées à partir des mêmes pieds mères atteints de psorose et mise en culture dans une chambre de culture sous des conditions artificielles.

### 2.2. Préparation du matériel végétal

Plusieurs facteurs ont été étudiés au cours de la techniques de microgreffage afin d'optimiser cette technique. A savoir :

- Effet de traitement fongique sur le taux de contamination du porte-greffe *Citrangé troyer*
- Influence des conditions de conservation des semences de *Citrangé troyer* sur le pouvoir germinatif
- Effet de l'origine des greffons prélevés sur le taux de réussite de microgreffage
- Effet de la variété sur le taux de réussite du microgreffage d'apex

#### 2.2.1. Effet de traitement fongique sur le taux de contamination du porte-greffe *Citrangé troyer*

Le matériel végétal utilisé pour le test du porte-greffe est constitué de de deux lots :

- des fruits de *Citrangé troyer*
- des pépins de *Citrangé troyer* décortiqués juste après la collecte des fruits

Les deux lots sont prélevés à partir des vergers appartiennent au parc semencier de centre technique des agrumes CTA. Ainsi e Traitement des fruits de *Citrangé troyer* s'effectue à maturité juste après la récolte en utilisant trois types de fongicide afin d'éliminer toute sorte de contamination (Tab.1). Les fruites traités sont ensuite séchés à l'air libre.

**Tableau 1** : Liste des différents fongicides utilisés dans le traitement des fruits de *Citrangé troyer*

Nom commercial du fongicide	Benlate	Methylthiophanate	Triziman
• Substance actif	Benomyl	Lagrophanate	Mancozèbe
• Teneur	100g/hl	250g/hl	250g/hl
• Formule chimique	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	$C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$	$(C_4H_6MnN_2S_4)_x(Zn)_y$

Par ailleurs les pépins de *Citrange troyer* sont traités selon la méthode suivante : trempage dans l'eau Eau de javel 6° pendant 15mn, ensuite enrobage avec les trois types : Benlate, methylthiophanate et Triziman

### 2.2.2. Influence des conditions de conservation des semences de *Citrange troyer* sur le pouvoir germinatif

En vue de comparer l'effet des conditions de conservation des pépins du porte greffe *Citrange troyer* sur leur pouvoir germinatif nous avons testé deux origines des graines :

- **Lot1** : les pépins semés sont issus des fruits de « *Citrange troyer* » traité par un fongicide, séchés et conservés à 4°C.
- **Lot2** : les pépins semés sont des graines de « *Citrange troyer* » qui ont été traités auparavant par un fongicide et conservés à 4°C

Indépendamment de l'origine du porte-greffe (fruit ou pépins conservés), ils subissent les mêmes étapes de désinfection à savoir :

- Décorticage des pépins et enlèvement des téguments externes et internes
- Trempage dans de l'eau de javel 12° (50%) additionnée de tween 20 pendant 15mn
- Rinçage (3 à 4 fois) à l'eau distillée stérile

Les pépins sont ensuite placés sur papier filtre stérile sous hotte à flux laminaire afin d'assurer leur séchage évitant ainsi le risque de développement des champignons saprophytes après leur mise en culture sur milieu de culture stérile. Après leur séchage les pépins stérile sont mis en culture dans des tubes à essais rempli de milieu de culture MS solidifié. Ces tubes sont placés à l'obscurité à une température de 27°C. Une fois germés les porte-greffes atteignent une taille de 4 à 5cm de hauteur et deviennent prêt au microgreffage *in vitro*.

### 2.2.3. Effet de l'origine des greffons prélevés sur le taux de réussite de microgreffage

Les greffons peuvent avoir deux origines :

- Prélevés directement à partir des copies pieds mères : les pousses sont prélevées directement à partir des copies pieds mères élevés sous insecte proof. Ces pieds sont effeuillés deux semaines à l'avance afin de favoriser l'émission de nouvelles pousse. Cette opération ne peut se faire que durant les deux périodes de pousses végétatives des agrumes à savoir l'automne et principalement la période printanière.

- Obtenus à partir de forçage *in vitro* : cette opération est réalisable tout au long de l'année. Il s'agit de prélever des baguettes à partir des pieds à assainir et de les forcer *in vitro*.

Ces baguettes sont tout d'abord désinfectées selon les étapes suivantes :

- Désinfection superficielle par trempage dans un mélange d'eau de robinet et d'eau de javel 9° additionné de quelques gouttes d'un mouillant (Tween20) ;
- Trempage pendant quelques minutes dans l'alcool 95° suivi d'un autre bain de l'eau de javel 9° pendant 15 minutes ;
- Rinçage avec l'eau distillée stérile (minimum trois rinçages) ;
- Séchage sous hotte sur papier filtre stérile pendant 10 minutes.
- Mise en culture dans des tubes à essai remplis d'eau distillée stérile.

Le forçage est assuré par la mise en place des tubes dans une chambre de culture à une température de 28 °C et une photopériode de 16 h /8h de lumière avec une intensité lumineuse de 3000 lux et pendant 10 à 14 jours (Fig.1)



Figure 1 : Forçage des baguettes des boutures des agrumes dans des conditions stériles

### 2.2.4. Effet de la variété sur le taux de réussite du microgreffage d'apex

Durant ce travail nous avons testé l'effet de la variété sur le taux de réussite du microgreffage d'apex. En effet, trois variétés sont testées à savoir :

- Maltaise demi sanguine
- Clémentinier Cassar
- Citronnier arbi

Ces variétés sont sélectionnées à partir des vergers de la région du Cap Bon (Gouvernorat de Nabeul /Tunisie) et le choix a été principalement fait sur la base des caractéristiques agronomiques à savoir : conformité variétale, productivité, qualité du fruit, etc. Des copies de ces variétés





sélectionnées sont obtenues par greffage sur un porte greffe «le Bigaradier» sain afin d'avoir un parc à bois qui servira comme un conservatoire des clones sélectionnés. L'élevage se fait sous insect-proof au Centre Technique des Agrumes (Unité de la Manouba).

### 2.3. Technique de microgreffage d'apex

La plantule de *Citrangue troyer* issue de semis est sortie du tube à essai à l'aide d'une pince stérile. Les cotylédons sont excisés et la plantule est coupée à environ 1 cm au-dessus de la racine. La partie basale de l'apex racinaire est éliminée. Cette dernière opération facilite l'insertion des

plantules greffées dans le trou du pont papier filtre placée dans le tube à essai de mise en culture rempli du milieu de culture liquide. Une incision en T inversé est exécutée à l'aide d'une lame de bistouri à l'extrémité supérieure de la tigelle du porte greffe. L'apex méristématique prélevé à partir des pousses stérilisées au préalable est inséré délicatement à la base de l'incision en T. Le plant microgreffé est placé dans un tube à essai rempli d'un milieu MS liquide (Fig.2). Les tubes sont ensuite transférés dans une chambre de culture à une température de  $27\pm 1^\circ\text{C}$  et une photopériode de 16/8 heures.

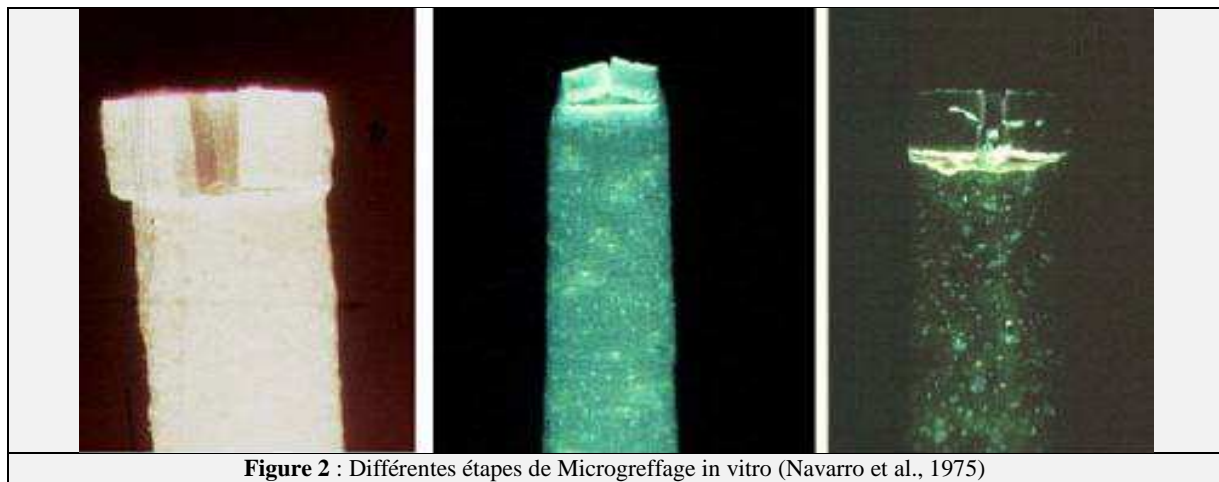


Figure 2 : Différentes étapes de Microgreffage in vitro (Navarro et al., 1975)

### 2.4. Acclimatation des plants microgreffés

Les plants micro-greffés réussis ayant au moins deux feuilles développées, sont déplacés dans une serre vitrée afin d'accomplir l'étape d'acclimatation. Ainsi, nous avons testé trois techniques d'acclimatation, à savoir :

**2.4.1. Acclimatation directe en pots :** les vitro-plants enracinés issues de la culture *in vitro* sont sorties de leurs tubes à essais et par la suite leur système racinaire est rincé à l'eau courante. Un habillage des racines est effectué suivi d'une mise en place dans des pots de 10 cm de diamètre et remplis d'un mélange de tourbe et du sable grossier. L'ensemble est recouvert d'un sachet plastique afin d'assurer une humidité saturante et ne sera progressivement éliminé qu'après l'apparition des premières feuilles.

**2.4.2. Acclimatation en couronne :** sur la partie supérieure du porte greffe décapité au préalable, une incision est effectuée où et la partie basale du vitro-plant enracinée taillée en biseau, est insérée.

L'ensemble est couvert de sachet plastique afin d'assurer une humidité saturante. Le sachet est enlevé dès l'apparition des nouvelles feuilles.

**2.4.3. Acclimatation par sur-greffage sur un porte-greffe :** cette technique se base principalement sur le greffage des vitro-plants enracinés sur des portes greffes vigoureux tel que le *citrus volkameriana* préalablement arqué, au minimum, une semaine à l'avance. Cette dernière assure la concentration de la sève au point de greffe favorisant ainsi une meilleure reprise de la plantule sur-greffée.

Le plant microgreffé est taillé en biseau au niveau de sa racine principale. Une languette est prélevée sur le porte greffe sous laquelle est placée la vitro-plantule taillée en biseau. Une ligature est assurée par le para-film afin de fixer porte greffe et vitro-plants. L'ensemble est couvert de sachet plastique. Son élimination se fait progressivement dès l'apparition de la première feuille après sur-greffage. Il est

totalément éliminé lorsque le vitro-plant sur-greffé atteint le stade quatre à cinq feuilles.

### 2.5. Contrôle virologique

Les maladies testées durant ce travail sont :

- La **Psorose** écailleuse encore dite Psorose A (CPsV)
- La maladie de la **Tristeza** (CTV)

La **Psorose A** constitue la maladie de dépérissement la plus communément répandue dans les agrumeraies Tunisiennes. Elle est particulièrement nuisible sur les variétés d'orangers et rarement sur les mandariniers. En plein champ, l'attaque est décelée par l'écaillage de l'écorce et l'exsudation de gomme aussi bien sur le tronc que sur les branches charpentières. Cependant, les symptômes foliaires se manifestent par des plaques éclaircies sous la forme d'empreintes en

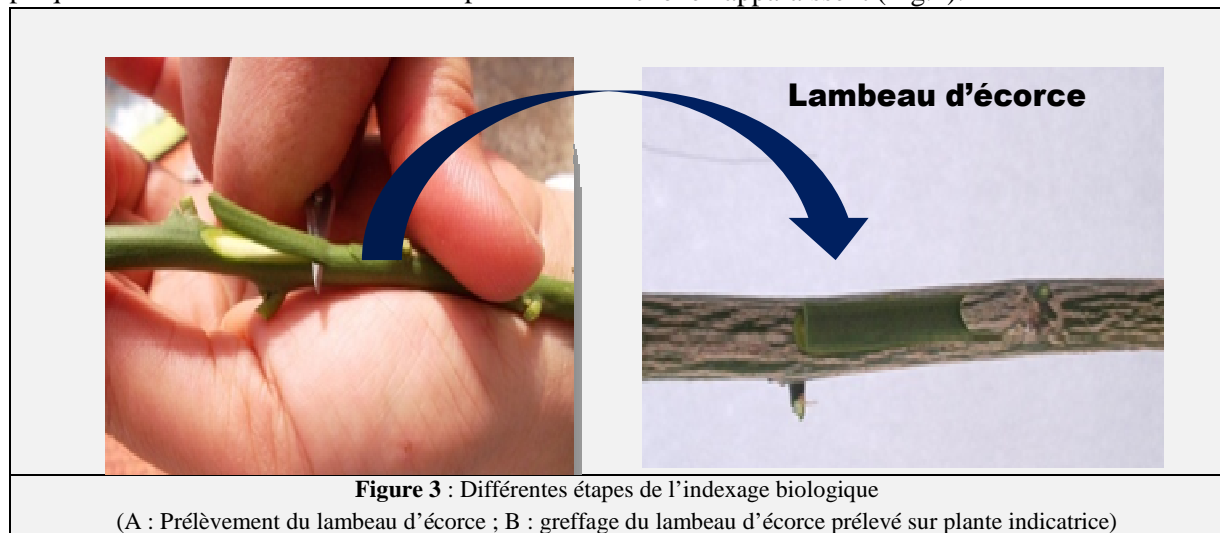
feuilles de chêne. Elle se transmet par greffage à partir de pied mère infecté.

La **Tristeza** est parmi les maladies les plus dangereuses des agrumes et a été détecté dans les vergers tunisiens depuis l'année 2012. Elle a été à l'origine du dépérissement de milliers de pieds d'agrumes à travers le monde et d'une centaine de pieds d'agrumes en Tunisie.

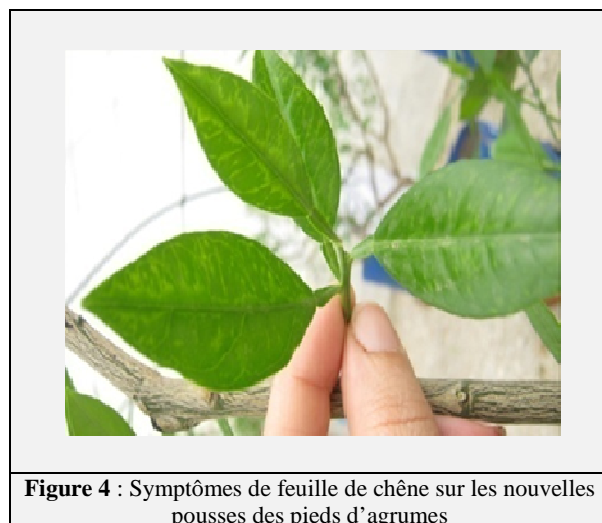
Les Techniques employées pour la détection de la Psorose A et de la Tristeza sont :

#### 2.5.1. Indexage biologique

Pour le dépistage de cette maladie, on utilise l'Orange Hamlin ou l'Orange Pineapple ou Mme Vinous comme plante indicatrice élevée sous serre vitrée. L'indexage se fait par greffage de deux lambeaux d'écorces de l'arbre à tester sur la plante indicatrice (Fig.3). Après 9 à 12 mois du date d'indexage, les symptômes caractéristiques de la présence de la maladie «de feuilles de chêne» apparaissent (Fig.4).



**Figure 3 :** Différentes étapes de l'indexage biologique  
(A : Prélèvement du lambeau d'écorce ; B : greffage du lambeau d'écorce prélevé sur plante indicatrice)



**Figure 4 :** Symptômes de feuille de chêne sur les nouvelles pousses des pieds d'agrumes

#### 2.5.2. Test sérologique : Test DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Conformément à la norme standard, le matériel végétal a été testé par la technique du Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays (DAS-ELISA) dont les principales étapes se résument comme suit :

- La sensibilisation de la plaque par des anticorps polyclonaux (IgG) spécifiques (Dilutions; CTV: 1/100, CPsV: 1/1000),
- L'addition du broyat végétal extrait (1g/10ml) dans un tampon d'extraction 1X,
- La fixation de l'antisérum (Dilutions Anti-IgG; CTV: 1/100, CPsV: 1/250),
- Développement de la réaction immunologique (pNPP: 1 mg/ml) et lecture des

absorbances optiques à 405 nm après 30 minutes, 1h et 2h.

Les étapes décrites ont été toutefois réalisées en adoptant une durée d'incubation de 2h à une température de 37°C, séparées par une série de lavages (3 x 3 min) moyennant le tampon approprié (1X).

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Effet du traitement fongique sur le taux de contamination des fruits de *Citrange troyer*

Les résultats obtenus en pourcentage de taux d'infection pour chaque type de traitement fongique montrent une différence qui n'est pas significative entre les différents fongicides utilisés. Par contre l'utilisation de Méthyl-thiophanate n'apparaît pas efficace car le pourcentage de contamination est le plus élevé et qui dépasse largement 40% et c'est pareille pour le fongicide Benlate (pourcentage de contamination est de l'ordre de 45,8%). Par contre la désinfection des fruits de *Citrange troyer* avec le fongicide Trizimane permet une

légère amélioration du risque de contamination qui est de l'ordre de 38,9% (Fig.5).

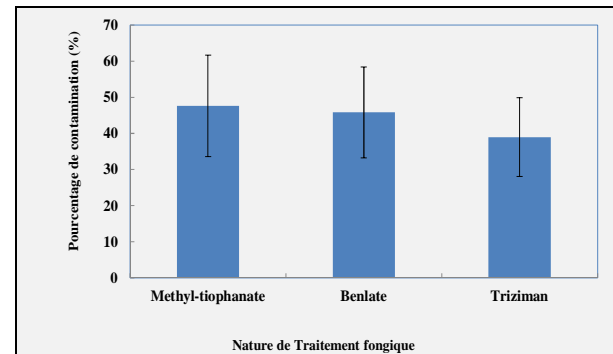


Figure 5 : Variation du pourcentage de contamination des fruits testés en fonction de la nature du fongicide utilisé

De même l'étude de l'effet du traitement fongique du fruit au cours du temps nous a permis de constater que le Trizimane est le meilleur traitement fongique à utiliser dans le but de conserver les fruits de *Citrange troyer* le plus long possible de temps (Fig.6).

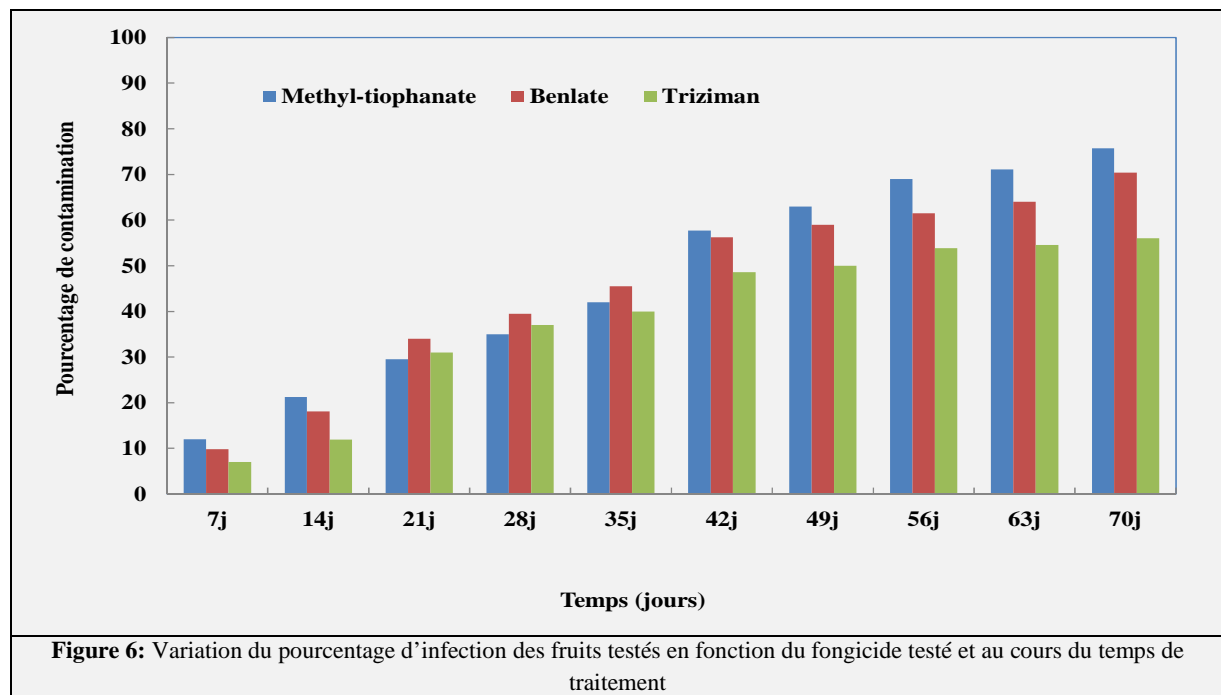
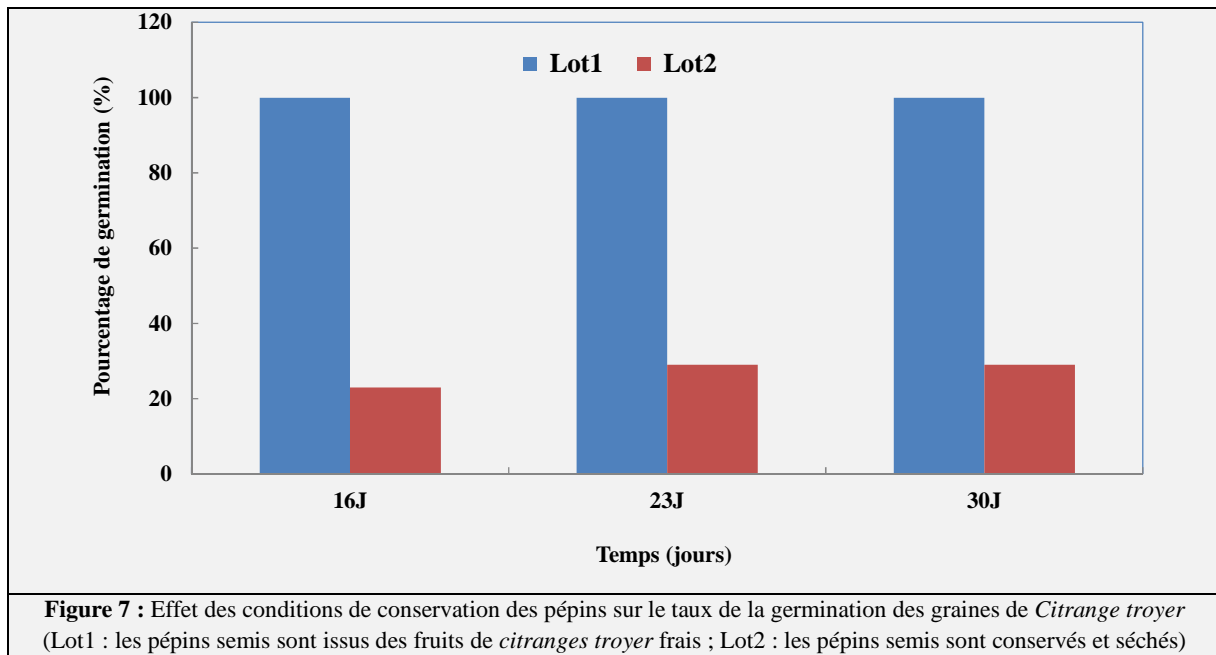


Figure 6: Variation du pourcentage d'infection des fruits testés en fonction du fongicide testé et au cours du temps de traitement

#### 3.2. Influence des conditions de conservation des semences de *Citrange troyer* sur le pouvoir germinatif

Le taux de germination des pépins d'agrumes restent l'obsession des spécialistes en microgreffage étant donné que la qualité des porte-

greffes obtenus est un principal facteur qui assure le bon déroulement de la technique de microgreffage d'apex méristématique des agrumes. En effet les résultats obtenus prouvent bien l'effet des conditions de conservation des pépins sur le taux de la germination (Fig.7).

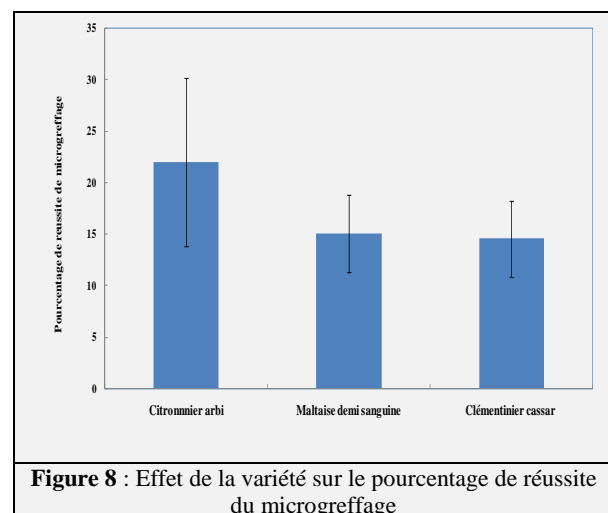


D'après les résultats obtenus, nous remarquons une dépendance entre le type de conservation des pépins et le pourcentage de germination. En effet, les pépins prélevés directement à partir des fruits de *Citrance troyer* (lot1) possèdent un pourcentage de germination plus élevé (jusqu'au 100%) par rapport aux pépins séchés et conservés (lot 2) dont le taux de germination ne dépasse pas 29% et il peut même atteindre 0%. Ainsi il sera intéressant de semer directement les graines de *Citrance troyer*.

### 3.3. Effet de la variété sur le taux de réussite du microgreffage

Durant ce travail trois variétés sont testées : le Clémentinier Cassar, le Citronnier arbi et la Maltaise demi sanguine. Les résultats obtenus en pourcentage de réussite des plantules microgreffées montrent la présence d'une corrélation positive entre la réussite du taux de microgreffage et l'origine variétale du greffon testé (Fig.8). En effet, le pourcentage obtenu varie d'une variété à l'autre. Le citronnier arbi présente le pourcentage de réussite le plus élevé qui est de l'ordre de 19%. Alors que le taux de réussite est de 13% pour la maltaise demi-sanguine et seulement 9% pour le citronnier Cassar. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Carimi et al. (1999) où ils ont démontré que le citronnier arbi repend le mieux à la technique de microgreffage d'apex avec un pourcentage de réussite de 42,5% par rapport aux autres variétés : *Valencia Late* et

*Mandarinier* où le pourcentage de réussite est respectivement 29,4% et 20,6 %. De même, durant les observations des plants microgreffés dans la chambre de culture, nous avons noté la même vitesse de croissance des plants microgreffés. En effet, les plantules de citronnier arbi présentent une croissance plus rapide et plus importante que pour les autres variétés.



### 3.4. Effet de l'origine des greffons sur le taux de réussite du micro-greffage

Dans le but de tester l'effet de l'origine des greffons sur la réussite de la technique de microgreffage, deux origines des pousses ont été testés :





**Origine1** : à partir des pieds-mère à assainir sélectionnés dans les verges de la CTA et élevés sous serre insect-proof (Fig.9).

**Origine2** : à partir des jeunes plants prélevés sur les mêmes pieds-mère à assainir et cultivés dans des conditions contrôlées (Fig.9)



**Figure 9** : les pieds-mère à assainir sélectionnés dans les verges de la CTA et élevés sous serre insect-proof

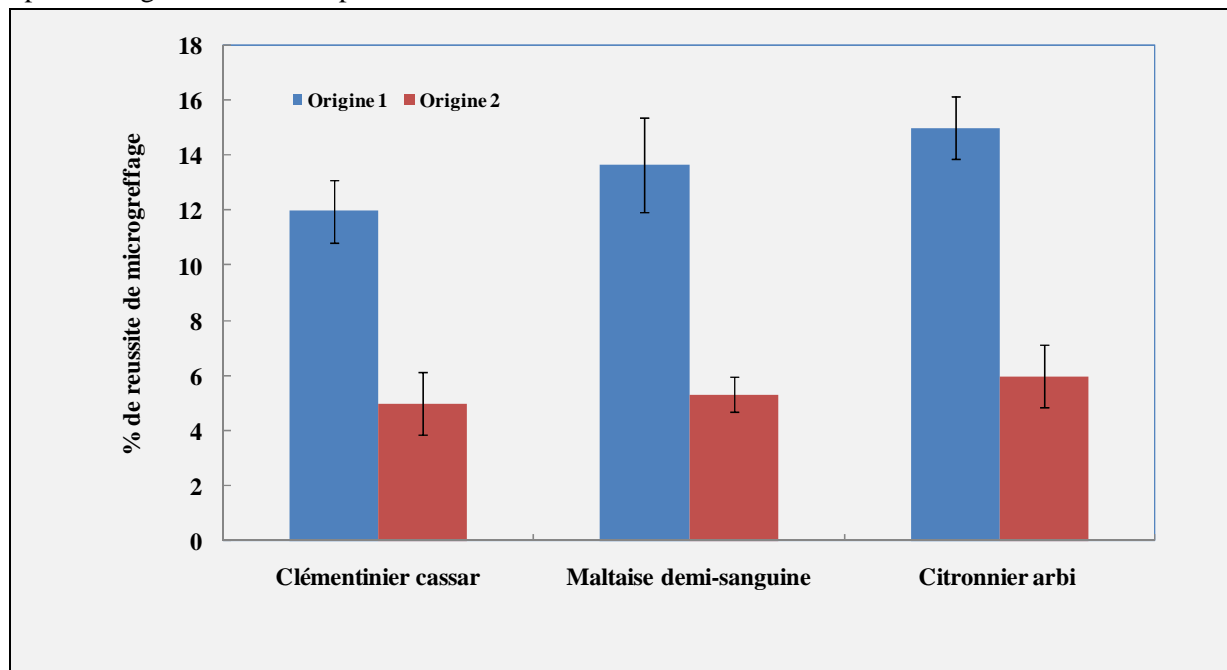
par micro-greffage des pousses originaires des baguettes forcés in vitro (Fig.10).

Par conséquent, ces résultats prouvent l'intérêt de l'utilisation des greffons prélevés à partir des pieds mère sous insect-proof dans des conditions naturelles qui permettent un pourcentage plus élevés par rapport aux baguettes forcés in vitro. De même technique nous assure la pratique de la technique de microgreffage durant toute l'année indépendamment du cycle végétative de l'espèce (Fig 11).



**Figure 10** : les jeunes plants prélevés sur les pieds-mère à assainir et cultivés dans des conditions contrôlées

Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de réussite microgreffage dépend étroitement de l'origine de greffon. En effet, les pousses prélevées directement à partir des pieds mères élevés sous serre insect-proof assurent un pourcentage de réussite supérieur à celui obtenus



**Figure 11**: Variation du pourcentage de réussite de microgreffage des plantes en fonction de l'origine des greffons utilisés

#### 4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le présent travail nous a permis de montrer que le traitement des semences des agrumes par le fongicide Triziman constitue le moyen le plus efficace grâce à son effet protecteur le plus élevé. En effet il présente un pourcentage d'infection inférieur (56%) par rapport au Méthyl-tiphanate au Bénlate qui présente respectivement 75,7% et 70,4%. De même nous avons pu montrer que le taux de germination des pépins fraîchement extrait des fruits est beaucoup plus élevé que celui des pépins séchés et conservés à 4°C. Pour la technique de microgreffage le taux de réussite vari selon la variété testée. En effet, le Citronnier arbi présente le meilleur pourcentage de réussite (19%) suivi par celui de la Maltaise demi – sanguine avec un pourcentage de réussite de l'ordre de 13% alors que le pourcentage le plus faible a été obtenu chez la variété Clémentinier Cassa 9%). Par ailleurs le taux de réussite de micro-greffage dépend aussi de l'origine des pousses utilisées. Les résultats montrent que le pourcentage de réussite est plus élevé chez les pousses prélevées directement à partir des pieds-mère élevés sous insect-proof par rapport à ceux prélevés sur des baguettes forcées in vitro dans des conditions contrôlées. A la suite des résultats obtenus, différentes suggestions peuvent être présenté afin d'améliorer les différentes étapes de micro-greffage des agrumes et assurer le meilleur taux de réussite. Il s'agit de :

- L'Utilisation des régulateurs de croissance dans le milieu de culture de germination du *Citrange troyer* tel que les gibbérellines (GA 3) pour les pépins séchés et conservés à 4°C afin d'améliorer leur taux de germination.
- l'amélioration de la composition de milieu de culture des plants micro-greffés pour les variétés à faible taux de réussites tel que le Clémentinier cassar.

#### 5. Références

Al-Barazi M, Schwabe W (1982) Rooting softwood cuttings of adult *Pistacia vera* L. J. Hort. Sci., 57(2): 247-252.

Barba M, Cupidi A, Amminabile A (1989) Uso del microinnesto in vitro per il risanamento del

Mandoro. Dans : Atti del Convegno Virosi ed Entomofauna del Mandoro, pp. 155-166.

Ben Abdallah F, Fnayou A, Grenan S, Ghorbel A (1996) Contribution à l'amélioration du microgreffage de la vigne. Bulletin de No. 785-786(69) : 601-616.

Bouزيد S (1983) Morphogenèse et possibilités nouvelles de multiplication végétative in vitro chez le Citrus. Thèse de Doctorat Es-Sci. Nat., Fac. SciT. unis p. 136.

Kalai L, Mnari-hattab M, Sadfi N, Mohamed RabeH Hajlaoui R (2010) Caractérisation de l'agent causal du Mal secco de l'oranger et évaluation de l'antagonisme bactérien vis-à-vis du *Phoma tracheiphila*. *Biologia Tunisie* Juillet 2010;N°7;45-50.

Gifruit (2014) Groupement Interprofessionnel des fruits. Date de consultation Mars 2014. <http://www.gifruits.com>.

Joley LE, Opitz KW (1971) Further experiences with propagation of *Pistacia*. Combined. Dans : Proceeding of the International Plant PropagatorSociety, 21 : 62-76.

Lakhoua H (1997) Quelques réflexions sur le développement de l'agrumiculture en Tunisie. *Revue de l'Institut National Agronomique de Tunisie*.12: 179-193.

Mosella-Chancell L (1979) Le microgreffage in vitro du pêcher (*Prunus persica* Batsch) : Influence de certains composés phénoliques. *CRAS (Série D)*, 289 : 567-570.

Morel, G, Morin C(1952) Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *C.R.Acad.Sci. Paris*, 235, 1324-1325.

Navarro L, Roistacher CN, Murashige T (1975) Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free Citrus. *J. Amer. Soc.Hort. Sci.* 100: 471-479

Navarro L (1981) Citrus shoot-tip grafting in vitro (STG) and its applications: a review. *Proc Int Soc Citricult* 1: 452-456

Sheibani A, Villiers TA (1995) Effect of explant type and culture medium on micropropagation of three *Pistacia* species. *Acta Horticulturae*, 41 9 : 229-232.

Tanne E, Shlamovitz N, Spiegel-Roy P (1993) Rapidly diagnosing grapevine Corky-Bark by in vitro micrografting. *HortSci.*, 28(6) : 667-668.

Vogel R, Nicoli M, Bové JM (1988) Le microgreffage de méristèmes in vitro. Son utilisation en Corse pour la régénération des agrumes. *Fruits*, 43(3) : 167-173.