

Une étude des agrumes sous contraintes environnementales (déficit hydrique, salinité et HLB) via la physiologie (photosynthèse), chimie (huiles essentielles) et biochimie (stress oxydatif), dans la perspective d'une adaptation de la culture par différentes approches préventives (prémunition, création porte-greffe et gestion de la polyploidie)

Encadrement :

Directeur : Luro François CRHC HDR tél: 04 95 59 59 46 francois.luro@inrae.fr HDR, INRAE (UMR AGAP Corse)

Co-directeur : Félix Tomi, Pr Université de Corse, UMR SPE (Corse) tomi_f@univ-corse.fr

Démarrage : Février 2024

Le porte-greffe dans la culture des agrumes

Les agrumes sont cultivés sous la forme d'une association variété / porte-greffe, le choix du porte-greffe détermine alors la tolérance de la plante à croître et à produire des fruits de qualité dans un environnement particulier, parfois sous contraintes. « *Aucun problème dans la culture des agrumes ne mérite plus de recherches minutieuses que celui des porte-greffes. Toute la gamme de la production d'agrumes est influencée par la relation entre le porte-greffe au scion et de l'adaptabilité des différentes combinaisons à l'environnement. On sait quelque chose, mais il reste encore beaucoup à découvrir.* » H. H. Hume 1957. Il n'existe pas d'autre espèces fruitières ou l'interdépendance entre les trois entités (scion/porte-greffe/environnement) ne soit aussi forte et l'équilibre aussi fragile que chez les agrumes.

L'importance d'un porte-greffe d'agrumes repose sur la distinction subtile entre les raisons générales et les caractéristiques individuelles pour lesquelles les porte-greffes sont utilisés. Un porte-greffe permet principalement de réduire la juvénilité (délai de mise à fruit) et à contrôler la vigueur de l'arbre par rapport aux semis; ainsi, les agrumes multipliés à l'aide d'un porte-greffe combiné à un scion indemne de pathogènes apportent un degré d'uniformité et de cohérence à un verger. Toutefois, les porte-greffes présentent de nombreuses caractéristiques individuelles qui contribuent positivement à la performance d'un agrume (Castle, 2010). Ils influencent divers caractères horticoles et offrent une tolérance aux ravageurs et aux maladies, ainsi qu'à certaines conditions du sol et du site, qui contribuent de manière significative à la rentabilité du verger. Les caractéristiques du porte-greffe, tels que le degré d'embryon nucellaire du pépin qui est lié à la facilité, au coût et à la cohérence de la propagation. Ces raisons combinées expliquent pourquoi la propagation des d'agrumes par greffage est depuis longtemps préférée à la bouture de scions prélevés sur des d'arbres matures.

Aujourd'hui, la sélection des porte-greffes d'agrumes se poursuit en mettant l'accent sur la création de porte-greffes qui réduisent la taille de l'arbre pour les vergers à forte densité et qui réduisent le délai de mise à fruit (précocité) des scions, caractéristiques nécessaires pour accroître la rentabilité des cultures. Bien entendu, les nouveaux porte-greffes doivent également permettre d'obtenir d'excellents rendements en fruits de haute qualité et posséder d'autres tolérances essentielles. (Tableau 1)

Tableau 1 : Les principaux attributs des porte-greffes d'agrumes (d'après Castle 2010)

Attribut	Remarques sur les caractéristiques en tant que critère de sélection des porte-greffes
1 Rendement	Une considération majeure

2	Précocité	Un facteur particulier dans le cadre de l'intérêt croissant pour les plantations à haute densité
3	Qualité du fruit	Un facteur important pour les producteurs de fruits frais
4	Taille du fruit	Suffisamment important pour être considéré séparément de la qualité
5	Qualité du jus	Brix et acidité, facteurs importants pour production de fruits frais ou destinés à la transformation.
6	Croissance de l'arbre	Considéré en termes de vigueur et de taille de l'arbre, un critère qui gagne en importance.
7	Compatibilité	La compatibilité végétative entre le scion et le porte-greffe est souvent importante.
8	Facilité de multiplication	principalement une question de production de semences et de degré d'embryonie nucléaire.
9	Pousse végétative	Un nouveau critère lié au Huanglongbing propagé par les psylles
10	Nutrition minérale	Il ne s'agit généralement pas d'un critère de sélection, mais il y a des effets de porte-greffe.
11	Salinité	Dans certains cas, un critère de sélection important
12	Sol argileux	hautes teneurs peuvent influencer le choix d'un porte-greffe
13	pH du sol élevé	Un facteur très important pour les porte-greffes à base d'oranger trifolié
14	Sol humide (inondation)	Il ne s'agit généralement pas d'un facteur de sélection, mais il peut être important
15	Sécheresse	Les méthodes d'irrigation modernes n'en font généralement pas un facteur de sélection
16	Froid (Gelées)	Souvent envisagé dans les régions menacées par le froid récurrent
17	Citrus Blight	À une certaine époque, il s'agissait d'une considération majeure
18	Phytophthora pourriture	Un facteur toujours important dans le choix des porte-greffes
19	Citrus nématode	Un problème plus universel avec des options de porte-greffe spécifiques
20	Tristeza virus	Une menace sérieuse avec certains porte-greffes
21	Exocortis (viroides)	Il n'y a généralement pas de menace aujourd'hui avec des bourgeons propres.
22	Huanglongbing (HLB)	Un trait majeur pour la recherche de nouveaux porte-greffes résistants (<i>en devenir</i>)

La liste n'est pas exhaustive mais présente les caractéristiques les plus importantes représentatives des industries agricoles mondiales.

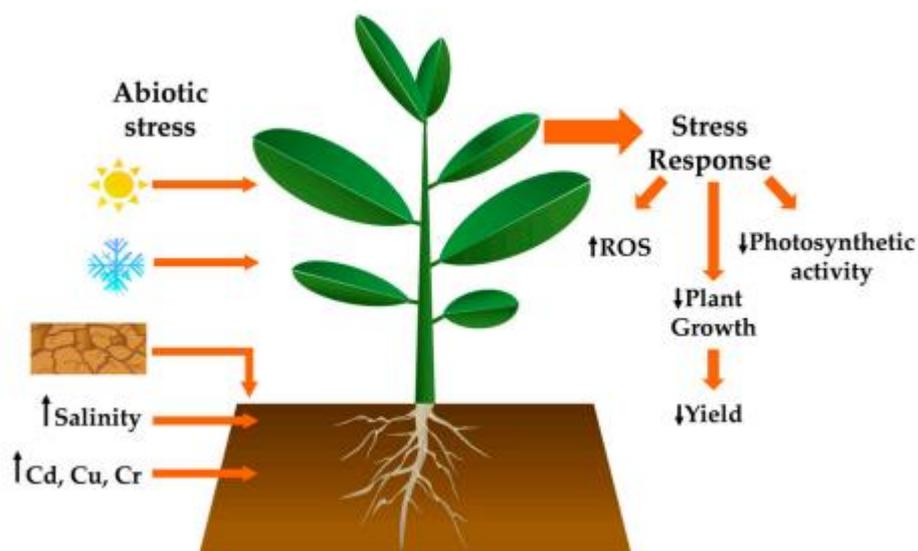
Le bigaradier en qualité de porte-greffe ne transmettant pas de tolérance ou résistance à la Tristeza à l'oranger a été remplacé au début du XX^e siècle par des agrumes déjà existants comme le poncirus, le Rough lemon, le volkameriana ou des mandariniers. Aucun d'entre eux ne satisfaisant pas toutes les exigences des capacités recherchées chez un porte-greffe, des hybrides intergénériques ont été étudiés et sélectionnés comme les citranges Carrizo, Troyer et C35 ou le citrumelo 4475. Ces hybrides possèdent tous en commun un parent, le *Poncirus trifoliata* porteur des résistances à la Tristeza, aux nématodes et au Phytophthora. Enfin, il est à noter que même s'il n'existe pas de matériel résistant strict à la maladie du HLB, certaines variétés triploïdes (Sivager et al, 2021) ou porte-greffes tétraploïdes (Sivager et al, 2022) confèrent une meilleure tolérance au HLB.

Les stress abiotiques liés au changement climatique

Le changement climatique accentue certaines contraintes, crée de nouvelles et par voie de conséquence donne plus de crédit à la sélection de porte-greffes adaptés à ces environnements. Des programmes officiels de sélection ont vu le jour et utilisent de nouvelles technologies telles que l'hybridation somatique et les marqueurs moléculaires qui modifient et élargissent l'éventail des possibilités de manipulation génétique en vue d'améliorer les porte-greffes (Kahn, 2007). La compréhension des mécanismes génétiques qui contrôlent le comportement des plantes vis-à-vis d'un stress est un premier pas vers la création de nouveaux porte-greffes mieux adaptés à telle ou telle contrainte de l'environnement. Les premières études menées sur l'hérédité d'un attribut recherché dans les porte-greffes furent celles menées sur la résistance (immunité) au virus de la Tristeza (Gmitter et al. 2007). Elles aboutirent à localiser le gène de résistance dans un fragment d'ADN cloné de d'oranger trifoliolé (*Poncirus trifoliata*) d'environ 140 k bases, suffisant pour développer des

marqueurs de sélection précoce. Le gène principal de résistance aux nématodes fut également repéré et des marqueurs génétiques du QTL furent développés.

Les stress hydrique (déficit) et salin sont des facteurs abiotiques que le changement climatique accentue. Le stress abiotique réduit le rendement des cultures. Les facteurs de stress environnementaux, tels que la chaleur, le froid, la sécheresse, salinité, et la présence de métaux lourds tels que le cadmium, le cuivre et le chrome mais également les stress biotiques comme la maladie du HLB induisent une réponse de la plante au stress, notamment une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS en anglais) et une réduction de l'activité photosynthétique, ce qui finit par réduire la production d'énergie et l'activité photosynthétique, et par conséquent la croissance des plantes et à terme donc le rendement des cultures. (Godoy et al. 2021). En bref, les facteurs de stress abiotique favorisent fréquemment la fermeture des stomates, augmentant l'activité de la voie photorespiratoire et déclenchant la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En outre, la diminution de l'absorption et de l'assimilation du CO_2 entraîne un déséquilibre du flux d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons de la photosynthèse, ce qui déclenche à nouveau la production de radicaux superoxydes et d'oxygène singulet (1O_2). Avec les radicaux hydroxyles (OH^-), l'excès de H_2O_2 , les radicaux superoxydes et l'oxygène singulet sont très réactifs aux protéines, aux lipides et aux acides nucléiques, les endommageant et provoquant la mort cellulaire. Un marqueur commun de la peroxydation des lipides, considérée comme l'un des principaux facteurs de risque de la maladie, est l'oxydation des lipides.



Les réactions de la plante vis-à-vis des stress

La tolérance de la plante réside alors dans sa capacité à mobiliser des réactions cellulaires de détoxification qui empêchent les ROS de s'accumuler (Arbona et al. 2008). Pour surmonter le stress oxydatif, les plantes possèdent des systèmes de détoxification enzymatiques et non enzymatiques. Dans le système enzymatique, les enzymes superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), monodéhydroascorbate réductase (MDHAR), déhydroascorbate réductase (DHAR), glutathion réductase (GR), glutathion transférase (GST), ascorbate peroxydase (APX), glutathion peroxydase (GPX) et guaiacol peroxydases (POX), entre autres, sont impliquées dans le piégeage des ROS. Ces enzymes présentent une activité plus élevée lorsque les plantes sont soumises à un stress. Le

mécanisme non enzymatique implique la production de composés tels que la proline, le glutathion (GSH), l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les flavonoïdes et les tocophérols, qui atténuent les dommages oxydatifs en neutralisant les ROS (Apel and Hirt, 2004 ; Foyer and Noctor, 2009).

Les composés organiques volatils (COV ou VOC en anglais) libérés dans l'atmosphère environnante joueraient un rôle infochimique dans l'interaction biotique (Maffei, 2010, Niinemets et al., 2013) et aussi dans l'acclimatation au stress abiotique. Les COV sont souvent considérés comme un mécanisme permettant aux plantes de réagir au stress et d'en atténuer les conséquences négatives (Loreto et Schnitzler, 2010).

Le porte-greffe a aussi un rôle dans la réaction au stress. La synthèse d'acide abscissique au niveau racinaire va réguler la conductance stomatique et par voie de conséquence la photosynthèse du scion (la variété greffée). Par ailleurs la régulation de l'absorption racinaire de l'eau ou des ions toxiques comme les chlorures, a un impact direct sur le comportement du scion en limitant l'intensité des stress salins et hydriques. Dans une expérience menée par notre équipe où des orangers greffés sur deux limes Rangpur l'une diploïde et l'autre tétraploïde, soumis à un stress hydrique, a démontré un très net accroissement de la tolérance par les porte-greffes tétraploïdes (Allario et al. 2018). Des résultats similaires ont été observés dans des cas de stress salin (Mouhaya et al. 2010). Une population d'hybrides tétraploïdes obtenus par croisement entre deux génotypes parentaux tétraploïdes a été récemment produite et testée par notre équipe Seapag- Agap pour leur capacité à développer des racines profondes et donc pouvoir mieux tolérer le déficit hydrique (Calvez et al, 2023).

Sujet et objectifs de la thèse :

Axe 1 : Dans un premier temps l'objectif de cette thèse est d'explorer les effets du déficit hydrique et du stress salin sur la composition et les propriétés aromatiques des huiles essentielles de zestes (PEO) et de feuilles d'agrumes (LEO). Cette étude s'ancre directement dans une problématique de qualité pour la société Cointreau qui achète la matière première (peaux d'oranges et de bigarades) dans des pays subissant ces contraintes environnementales.

Pour cela des arbres adultes en pots seront conduits sous serre et le stress des arbres sera mesuré physiologiquement, avec des indicateurs tels que la conductance stomatique, l'activité photosynthétique, l'activité du PSII et la charge en polyphénols. Une évaluation chimique du stress oxydatif sera également réalisée par dosage des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des activités enzymatiques de détoxification (SOD, CAT, APX, MDHAR). Le rôle de la messagerie chimique au cours du stress sera également étudié sur ces mêmes arbres en cinétique via l'analyse des composés organiques volatils (VOC) captés à l'aide de sondes SPME. Les extraits des plantes (VOCs ou LEO) des arbres stressés seront ensuite pulvérisés sur des arbres en pots afin de vérifier d'éventuels effets de prémunition (activation des mécanismes de défense) lorsqu'ils seront ensuite soumis à un stress hydrique et/ou salin. Là encore, la physiologie et l'enzymologie nous renseigneront sur l'état de stress des arbres traités (prémunis) versus arbres non traités.

Axe 2 : Evaluation de l'impact de du HLB sur des bigaradiers diploïdes et tétraploïdes greffés sur différents porte-greffes diploïdes et tétraploïdes. Un tel dispositif a été planté en Guadeloupe dans le cadre d'un partenariat entre le Cirad et les groupes Campari France et Cointreau. Le matériel rentre aujourd'hui en production. De part la physiologie des tétraploïdes, il est attendu des modifications en termes de rendement et de composition en huiles essentielles en fonction des associations mais également en lien avec l'impact de la maladie. Il est proposé de réaliser une analyse approfondie des différentes associations [porte-greffe / greffon] au niveau physiologique et biochimique (analyse du

stress oxydatif) en ce qui concerne leur tolérance à la maladie. De même une analyse précise de l'impact de la maladie sur les composés et leur rendement en huiles essentielles va être réalisée.

Axe 3 : A partir de la deuxième année, nous envisageons une étude de la ségrégation de la tolérance aux stress hydriques et salins sur une population d'hybrides issus d'un croisement entre deux porte-greffes aux réponses contrastées à ces contraintes, citron Volkamer et le citrumelo 4475 (Jacquemond et al. 2012). Le citron Volkamer n'est pas le plus performant en matière de tolérance au stress hydrique (Hussain et al. 2018). Ne disposant d'une population en effectif suffisant (60 hybrides) pour développer une approche QTLs, mais néanmoins trop grande pour faire une étude physiologique complète, nous utiliserons les critères pertinents et simple d'utilisation pour mesurer la variation de comportement des hybrides vis-à-vis de deux stress. En cela, la première expérimentation sur quelques arbres permettra de choisir le meilleur indice. D'autres critères, morphologiques propres aux porte-greffes, seront aussi mesurés tels que le volume racinaire, la croissance des arbres, l'épinastie ou la nécrose foliaire. Des regroupements d'hybrides par type de comportement (Bulk Segregant Analysis) permettront ensuite de mener des études d'expression (RNAseq) afin d'identifier les gènes impliqués dans la tolérance. Cette deuxième axe aura aussi pour objectif de tester cette voie d'amélioration pour générer des porte-greffes mieux adaptés à des environnements de plus en plus contraignants. Les deux géniteurs sont des hybrides interspécifique cédrat /mandarine pour le premier et intergénérique pomelo/poncirus pour le second (Curk et al. 2016). Ce croisement combine donc 4 géniteurs ancestraux (mandarine, poncirus, cédrat et pamplemousse), la diversité allélique n'en sera que plus grande de même que les combinaisons génétiques, offrant ainsi une certaine garantie d'un panel élargi de comportements vis-à-vis des stress et donc une meilleure prédiction du gain génétique.

Bien entendu, les effets sur la croissance du scion et de la qualité de sa production fruitière ne pourront pas être abordés durant la thèse car la population n'est encore qu'à un stade juvénile puisqu'issue de pollinisations réalisées en 2021. Néanmoins la préparation d'un dispositif pour une étude agronomique ultérieure sera envisagée en multipliant par bouturage les hybrides les plus tolérants et en y greffant du clémentinier.

La programmation des activités: de la thèse

Année 1 :

- Expérimentation de l'effet du déficit hydrique sur la composition et les propriétés aromatiques des huiles essentielles des oranges et des clémentines ; sur arbres adultes en pot (CPG-SM – Université de Corse) (Cointreau) / bilan photosynthèse et biochimique (évaluation du stress)
- Captage des VOCs et analyse compositionnelle
- Expérimentation de prémunition d'un traitement VOC ou PEO / physiologie et biochimie
- Analyse physiologique du comportement des différentes associations porte greffes/greffons diploïdes et tétraploïdes
- Envoi en Corse d'échantillons lyophilisés pour analyses biochimiques du stress oxydatif des différentes associations porte greffes/greffons diploïdes et tétraploïdes

Envoi en Corse d'échantillons lyophilisés pour analyse d'huiles essentielles pour analyse des composés et rendements des différentes associations porte greffes/greffons diploïdes et tétraploïdes *Année 2 :*

- Expérimentation du déficit hydrique sur la population en ségrégation (physiologie et notation) + prélèvement d'échantillons (feuilles) pour analyses biochimiques

- Expérimentation du stress salin sur la population en ségrégation (physiologie et notation) + prélèvement d'échantillons (feuilles) pour analyses biochimique et minérales (Dosage ions chlorures)
- Mesure de la croissance et du développement racinaire de chacun des hybrides
- Extraction ARN des Bulk d'hybrides et séquençage RNAseq

Année 3 :

- Traitement bioinfo des RNAseq
- Rédaction d'articles
- Rédaction du rapport de thèse

Partenariat :

Les analyses par chromatographie des huiles essentielles et des VOCs seront faites à l'Université de Corse (UMR 6134 SPE, Pr F. Tomi et Marc Gibernau, CR CNRS)

Les propriétés aromatiques des PEO des arbres stressés et témoins seront déterminées par analyse sensorielle au sein de la société Cointreau (panel d'experts)

Les analyses des composantes du stress oxydatif (H₂O₂, activités enzymatiques de SOD, CAT, APX, etc.) seront réalisées à l'Université de Corse au laboratoire de biochimie et d'enzymologie en collaboration avec le Pr Jérémie Santini (UMR 6134 SPE).

Les banques RNA seront faites à Montpellier sur la plateforme de génotypage de l'UMR Agap (Pierre Mournet) tandis que le séquençage RNA sera sous-traité avec une société privée.

Le dosage des ions chlorure et sodium dans les feuilles des arbres soumis au stress salin sera réalisé au CIRAD de Montpellier ou l'ODARC (Office de Développement Agricole Régional Corse) ou à l'université de Corse.

Le Cirad de Guadeloupe sera en charge de l'analyse physiologique des différentes associations porte greffes/greffons diploïdes et tétraploïdes cultivées sous contrainte HLB.

Références :

- Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, J. M., Tadeo, F., Froelicher, Y., Talon, M., et al. (2011). Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *J. Exp. Bot.* 62, 2507–2519. doi: 10.1093/jxb/erq467
- Allario T, Brumos J, Colmenero-Flores JM, Iglesias DJ, Pina JA, Navarro L, Talon M, Ollitrault P, Morillon R. (2013) Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant Cell Environ.* 36: 856-68.
- Apel, K.; Hirt, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004, 55, 373–399.
- Arbona V, Hossain Z, López-Climent MF, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A (2008) Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiol Plant* 132:452–466
- Calvez L, Dereeper A, Perdereau A, Mournet P, Miranda M, Bruyère S, Hufnagel Maciel B, Froelicher Y, Lemainque A, Morillon R, Ollitrault P. (2023) Meiotic behaviors of allotetraploid citrus drive the interspecific recombination landscape, the genetic structures, and traits inheritance in tetrazog progenies aiming to select new rootstocks. *Plants*, 12, n.spéc. *Advances in Breeding, Genetics, and Genomics of Citrus*:1630, 26 p. <https://doi.org/10.3390/plants12081630>

- Castle W. S. A Career Perspective on Citrus Rootstocks, Their Development, and Commercialization. *Hortscience* 45(1):11–15. 2010.
- Curk Franck, Frédérique Ollitrault, Andres Garcia-Lor, François Luro, Luis Navarro and Patrick Ollitrault (2016) Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers *Annals of Botany* Doi:10.1093/aob/mcw005.
- Foyer, C.H.; Noctor, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 2009, 11, 861–905
- Gmitter Jr F.G., Deng Z. and Chen C. 2007 Cloning and characterization of disease resistance genes. *In* Khan I. (ed.): *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. CABI publishing, Londres, 287-305
- Godoy, F.; Olivos-Hernández, K.; Stange, C.; Handford, M. Abiotic Stress in Crop Species: Improving Tolerance by Applying Plant Metabolites. *Plants* 2021, 10, 186. <https://doi.org/10.3390/plants10020186>
- Hussain, S., Khalid, M.F., Saqib, M. *et al.* Drought tolerance in citrus rootstocks is associated with better antioxidant defense mechanism. *Acta Physiol Plant* **40**, 135 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2710-z>
- Jacquemond C., Curk F., Froelicher Y. & Luro F. 2013. Variétés et porte-greffes : création, description et sélection, *dans* : Les clémentiniers et autres petits agrumes. Jacquemond C., Curk F. Heuzet M. coord. Quae Editions Collection *Savoir-Faire* Versailles, France. 37-108.
- Loreto F, Schnitzler JP. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends Plant Sci.* 2010 Mar;15(3):154-66. doi: 10.1016/j.tplants.2009.12.006.
- Maffei M.E. 2010 Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany* 76 (2010) 612 – 631
- Mouhaya W, Allario T, Brumos J, Andres F, Froelcher Y, Luro F, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (2010) Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Funct Plant Biol* 37:674–685
- Niinemets, U., Kannaste A., Copolovici L. 2013. Quantitative patterns between plant volatile emissions induced by biotic stresses and the degree of damage. *Front. Plant Sci., Sec. Plant Pathogen Interactions* volume 4 - 2013 | <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00262>
- Sivager G., Calvez L., Bruyere S., Boisne-Noc R., Brat P., Gros O., Ollitrault P., Morillon R. (2021). Specific physiological and anatomical traits associated with polyploidy and better detoxification processes contribute to improved tolerance to HLB of the Persian lime compared with the Mexican lime. *Front. Plant Sci.*, 26 August 2021 | <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.685679>
- Sivager G, Calvez L, Bruyere L, Boisne-noc L, Hufnagel B, Cebrian-Torrejon G, Doménech-Carbó A, Gros O, Ollitrault P, Morillon R (2022). Better tolerance to Huanglongbing is conferred by tetraploid Swingle citrumelo rootstock and is influenced by the ploidy of the scion. *Front. Plant Sci.*, 03 November 2022 <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1030862>