

**التقييم الجيني لأصول القوارص المستعملة
بالبلاد التونسية**

**CARACTERISATION GENETIQUE DES PORTE-GREFFES
D'AGRUMES UTILISES EN TUNISIE**

**Hager Snoussi Trifa^{1,3}, Rim Bou H'lel¹, Zina Bel Falah¹, Mehdi Ben Mimoun², Emna
Jedidi Néji¹, Asma Najjar¹, Marie-France Duval³, Patrick Ollitrault³**

1. Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie. INRAT, Rue Hédi Karray - 2049 - Ariana - Tunisie. E-mail : snoussi.hager@iresa.agrinet.tn

2. Institut National Agronomique de Tunisie. 43 avenue Charles Nicolle 1082 Tunis – Mahrajène, Tunisie

3. Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement. CIRAD Flhor TA50/PS4 Boulevard de la Lironde, 34398 Montpellier cedex 5, France

RESUME

L'industrie des agrumes en Méditerranée fait face à une combinaison complexe de stress biotiques, principalement le virus de la Tristeza (CTV) et *Phytophthora*, et de stress abiotiques (salinité/alcalinité) particulièrement dans la partie du Sud et de l'Est du bassin méditerranéen. En Tunisie, malgré la tolérance du bigaradier, porte-greffe le plus employé, à l'alcalinité, la salinité et sa résistance à *Phytophthora* ainsi que la bonne qualité de fruits qu'il confère, ses combinaisons avec les variétés commerciales sont sensibles au CTV. Par conséquent, il est urgent d'identifier d'autres porte-greffes résistants au CTV et bien adaptés aux autres contraintes de la région particulièrement la salinité et les sols calcaires, tout en conférant une bonne qualité et taille des fruits. Avant d'entamer le programme d'amélioration, un travail de mise au point s'est proposé d'analyser le germoplasme local en porte-greffes d'agrumes en commençant par : **1)** le contrôle de la conformité génétique des collections de porte-greffes à Sbikha et El Gobba, **2)** l'analyse de la diversité génétique des porte-greffes régionaux, en l'occurrence, le Bigaradier, afin d'identifier le(s) porte-greffe(s) le(s) plus adapté(s) pour chaque région (tolérance à la salinité). Pour ce fait, un certain nombre de visites ont été réalisées un peu partout en Tunisie et ont permis de recenser et collecter 206 accessions de porte-greffes d'agrumes. Pour les deux

objectifs, la caractérisation génétique était basée sur les STMS (marqueurs microsatellites) développés et sélectionnés au CIRAD (Montpellier) sur la base de leur polymorphisme et leur stabilité. Les prospections des bigaradiers locaux et leur caractérisation génétique permettront d'éviter qu'il y ait perte de diversité des ressources locales, sachant que même si le bigaradier est menacé par la Tristeza il constitue un matériel local très intéressant en matière d'adaptation aux conditions abiotiques locales (salinité en l'occurrence).

Mots clé : agrumes, porte-greffe, salinité, CTV, diversité génétique, microsatellites

المخلص

إن زراعة الحمضيات في البحر الأبيض المتوسط تواجه مجموعة مركبة من الشدائد الحيوية، خاصة الفيتوفتورا و فيروس التريستازا، و الشدائد اللاحيوية (الملوحة/ القلوية) خصوصا بالجهة الجنوبية و الشرقية للبحر الأبيض المتوسط. في تونس، رغم تحمل الأرنج، الأصل الأكثر استعمالا، للقلوية، للملوحة، مقاومته للفيتوفتورا، كذلك جودة الغلال التي يساهم فيها، تعتبر تركيباته مع الأصناف التجارية حساسة لفيروس التريستازا. لهذا فإنه من الضروري و العاجل اكتشاف و تقييم أصول أخرى للحمضيات تكون مقاومة للتريستازا و متلائمة مع الضغوطات الأخرى بالجهة خاصة منها الملوحة و التربة الكلسية مع كونها تساهم في إعطاء غلال ذات حجم جيد و جودة عالية. قبل بدء برنامج التحسين النباتي للحمضيات، تولى هذا العمل دراسة مجموعة أصول الحمضيات الموجودة بالبلاد التونسية و ذلك ب: 1/ التثبت من خلال التحليل من المطابقة الوراثية لمجموعات أصول الحمضيات بالسبخة و القبة، 2/ تحليل التنوع الوراثي لأصول الحمضيات المحلية، خاصة منها الأرنج، وذلك للتعرف على الأصل أو الأصول الأكثر تكيفا بكل جهة (تحمل الملوحة). و في هذا الشأن تم القيام بزيارات استكشافية بالعديد من الجهات بالبلاد و إحصاء و جمع 206 أصلا للحمضيات. وإجابة لهذين الهدفين، تم التحليل بواسطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية وذلك باستعمال مؤشرات جزئية (STMS) متبسطة ومنتخبة للحمضيات بمركز التعاون الدولي في البحوث الزراعية للتنمية (السيراد مونتيلي- فرنسا) على أساس تعدد أشكالها و ثباتها. إن استكشاف أصول الأرنج المحلية و تحليلها الوراثي سيمكن من المحافظة عليها وذلك بتقادي ضياع و تلاشي تنوع الموارد الجينية المحلية، علما و أنه على الرغم من أن الأرنج مهددا بالتريستازا فإنه يمثل مورد نباتي محلي مهم و فعال بشأن التكيف مع الظروف المحلية اللاحيوية (ملوحة مياه الري).

الكلمات المفاتيح: الحمضيات، أصل، ملوحة، فيروس التريستازا، التنوع الوراثي، تقانة الميكروساتيليت

I- INTRODUCTION

Différentes hypothèses ont été formulées sur l'origine des agrumes. En général, les agrumes sont supposés être originaires des régions tropicales et subtropicales du Sud-est asiatique et propagés ensuite aux autres continents (Webber, 1967 ; Calabrese, 1992). Cependant la taxonomie et la phylogénie des agrumes sont très compliquées, controversées et pas claires, ce qui est

dû principalement à la compatibilité sexuelle entre les agrumes et les genres apparentés, la fréquence élevée des mutations du bourgeon et la longue histoire de la culture et de la dispersion sauvage des agrumes (Nicolosi *et al.*, 2000). L'industrie des agrumes en Méditerranée fait face à une combinaison complexe de stress biotiques, principalement le virus de la Tristeza (CTV) et *Phytophthora*, et de stress abiotiques (salinité/ alcalinité) particulièrement dans la partie du Sud et de l'Est du bassin méditerranéen. L'utilisation de porte-greffe s'est généralisée en agrumiculture au milieu du 19^{ème} siècle suite aux dégâts provoqués par la gommose à *Phytophthora* sur les agrumes cultivés franc de pied. De nombreux porte-greffes ont été testés et recommandés. Malgré la tolérance de certains porte-greffes traditionnels à l'alcalinité, la salinité et à *Phytophthora* et la bonne qualité de fruits qu'ils confèrent, leurs combinaisons avec les variétés commerciale sont sensibles au CTV. C'est le cas du Bigaradier (*C. aurantium*) qui reste le porte-greffe le plus employé dans le bassin méditerranéen ; et presque le seul en Tunisie, il est tolérant à cette maladie, mais il ne transmet pas cette tolérance au scion. Des porte-greffe de substitution sont donc recherchés pouvant combiner des caractères de résistances aux maladies, en premier lieu à la Tristeza, des adaptations aux conditions particulières environnementales et une compatibilité avec la variété greffée. Avant d'entamer le travail d'amélioration, on s'est proposé de mettre au point l'analyse du germoplasme local en porte-greffes d'agrumes en commençant par : **1)** le contrôle de la conformité génétique des collections de porte-greffes à Sbikha et El Gobba, **2)** l'analyse de la diversité génétique des porte-greffes régionaux, en l'occurrence, le Bigaradier, afin d'identifier le(s) porte-greffe(s) le(s) plus adapté(s) pour chaque région (tolérance à la salinité). Les microsattellites sont parmi les marqueurs les plus puissants pour révéler du polymorphisme. Ils sont de plus en plus fréquemment utilisés pour de nombreuses études. Ils constituent d'excellents marqueurs génétiques, spécifiques du locus, co-dominants et hautement polymorphes (De Vienne et Santoni, 1998 ; Santoni *et al.*, 2000). A court terme, la caractérisation génétique du germoplasme tunisien des porte-greffes d'agrumes et le contrôle de la conformité génétique des collections existantes, offriront une garantie et une sécurité sur l'homogénéité des arbres mères des schémas de multiplication des porte-greffes.

II- MATERIEL ET METHODES

2-1- Matériel Végétal

Pour le contrôle de la conformité génétique des collections, notre travail s'est porté sur 160 porte-

greffes répartis sur deux parcs semenciers (plantés en 1996), celui de Sbikha et celui d'El Gobba. Nous avons collecté des feuilles de 80 échantillons du parc semencier du GI-Fruits de Sbikha qui contient une collection de 8 porte-greffes, à raison de 10 arbres par porte-greffe. Les porte-greffes existants dans cette collection sont : Citrange Carrizo, Bigaradier Gou Tou, *Citrus macrophylla*, *Citrus volkameriana*, Mandarinier Cléopâtre, Citrange Troyer, Rough Lemon et Bigaradier. Les semis des porte-greffes sont issus de Turquie et de Corse. Semés à la Station d'Assainissement de Manouba, les baguettes issues des semis des différents porte-greffes ont été greffées sur bigaradier. Les 80 autres échantillons sont du parc semencier du GIAF El Gobba qui lui renferme une collection de 8 porte-greffes mais avec un nombre de pieds par porte-greffe important variant de 55 pour le Mandarinier Cléopâtre à 132 pour le Bigaradier. Pour standardiser l'échantillonnage entre les deux collections, les feuilles des 10 premiers pieds de chaque ligne de porte-greffe ont été collectées. Les porte-greffes existants dans cette collection sont : Citrange Troyer, Bigaradier, Mandarinier Cléopâtre, Citrange Carrizo, Bigaradier Gou Tou, Citrumello Swingle, Rough Lemon et *Citrus volkameriana*. Les porte-greffes de Corse qui ont été envoyés en Tunisie pour la création des parcs semenciers vont servir de témoins pour le contrôle de la conformité génétique de nos porte-greffes. Pour chaque porte-greffe des collections tunisiennes, il a été proposé un ou plusieurs porte-greffe témoin de Corse, et ce pour offrir une base de données plus large pour les comparaisons, du fait que les données relatives aux plants d'origine ne sont pas précises. Les feuilles ont été lavées à l'éthanol 70%, puis rincées à l'eau distillée. Elles ont été ensuite broyées en présence d'azote liquide. L'extraction d'ADN a été réalisée en utilisant le Kit de purification de l'ADN génomique the Wizard Genomic DNA purification Kit de Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Une parcelle collection de porte-greffes appartient à l'INRAT, (El Gobba), et vu le contexte de ce travail et les objectifs d'identifier les porte-greffe des deux parcs semenciers, il a été proposé d'inclure les individus de cette collection, dans un même but de vérifier l'homogénéité et la conformité des porte-greffe qui la constituent. Cette collection renferme : des Citrange Carrizo et Troyer, des *Citrus volkameriana* et *macrophylla*, *Poncirus trifoliata* et Mandarinier Cléopâtre. Pour l'analyse de la diversité génétique des porte-greffes régionaux, une prospection vient d'être réalisée un peu partout en Tunisie afin de collecter les porte-greffes régionaux tolérants à la salinité et les plus adaptés à chaque région.

2-2- L'amplification PCR et la détection des loci microsatellites

Treize marqueurs microsatellites ont été appliqués pour l'amplification de l'ADN : 7 loci microsatellites génomiques et 6 loci microsatellites provenant d'EST (*Expressed Sequence Tags*). Ces amorces ont été développées pour être appliquées sur les agrumes (Froelicher et al., 2000). Elles ont été sélectionnées pour leur taux de polymorphisme élevé et pour la bonne qualité de leurs profils. Les analyses microsatellites ont été réalisées radioactivement par phosphorylation des extrémités 5' des amorces "Reverse" avec du (γ -³³P) ATP, en présence de la T4 polynucléotide kinase. L'analyse des produits d'amplification s'effectue par électrophorèse en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide 5%. L'observation des profils de migration a permis de repérer un ou deux allèles par locus et par individu analysé. La taille des allèles à chaque locus a été déterminée sur base des allèles de contrôle dont on connaît la taille pour chaque primer par des études antérieures. La lecture visuelle des gels a permis d'identifier les allèles à chaque locus marqueur. Un indice de dissimilarité (de Dice) (Dice, 1945) est calculé pour chaque paire d'individus. Une représentation arborée de la diversité est ensuite construite à partir de la matrice des dissimilarités en utilisant la méthode de classification ascendante hiérarchique (UPGMA). L'ensemble de cette analyse est réalisé à l'aide du programme informatique Darwin®, développé par le CIRAD FLHOR de Montpellier (Perrier et al. 2003).

III- RESULTATS ET DISCUSSION

3-1- Contrôle de la conformité génétique des collections de porte-greffes à Sbikha et El Gobba

Les analyses ont révélé plusieurs groupes plus ou moins homogènes :

- Groupe des Citronniers, comportant les espèces *Citrus macrophylla*, *volkameriana*, *amblycarpa*, Rough lemon (*Citrus gerberi*), Lime rangour, Lime mexicaine.
- Groupe des mandariniers, regroupant les Mandariniers Cléopâtre, Mandarinier Sunki et Bintangor Sarawak.
- Groupe des *Poncirus trifoliata*, regroupant les variétés *Poncirus* Krider, *Poncirus* Flying Dragon, *Poncirus* Rubydoux.
- Groupe des *Citrumellos* représenté par *Citrumello* 1452, *Citrumello* 4475, *Citrumello* Swingle et *Citrumello* Sacaton.
- Groupe des Citranges divisé en *Citrange* Carrizo et *Citrange* Troyer
- Groupe des Bigaradiers représenté par les Bigaradiers et les Bigaradiers Gou Tou.

Ce travail a permis d'identifier les porte-greffes conformes aux témoins de Corse dans les différentes collections. Cependant, plusieurs erreurs d'étiquetage ou d'identification ainsi que des mélanges ont été repérés au sein des collections analysées. La vérification de la morphologie des arbres soupçonneux a confirmé l'analyse moléculaire.

3-2- Prospection de porte-greffe d'agrumes utilisés en Tunisie :

Un certain nombre de visites ont été programmées et les collectes faites principalement dans les régions voisines de Tunis ont permis de recenser et collecter 206 accessions.

Tableau : Effectif des porte-greffes collectés selon les régions

Région	Nombre d'accessions collectées
Bizerte	15
Cap - Bon	72
Mornag - Khlidia (Tunis)	18
Béjà	18
Jendouba	9
Kairouan	34
Tozeur (Midès, Tamerza, Degache)	23
Gafsa	8
Gabes	5
Jerba	4
Total	206

La visite de certains vergers anciens ou du sud tunisien, a permis la collecte de quelques porte-greffes et variétés remarquables où la salinité des eaux est montée jusqu'à 5g/l. L'utilisation d'outils biotechnologiques servira pour la vérification de l'identité de ces porte-greffes régionaux. En parallèle, des tests de salinité et des analyses physiologiques vont être réalisés afin de pouvoir désigner le(s) porte-greffe(s) le(s) plus adapté(s) pour chaque région.

Conclusion

L'impact pratique de ce travail est d'aider à la gestion des collections tunisiennes de porte-greffe qui sont distribués aux pépiniéristes et aux agriculteurs. La confirmation de l'identité exacte et de l'homogénéité du matériel distribué offre une garantie de propagation d'un bon matériel loin des mélanges, des erreurs d'étiquetage et des plants qui sont soupçonnés d'origine sexuée. D'autant plus que le risque de multiplication non conforme est d'autant plus élevé que le nombre d'embryons nucellaires par graine est faible. Des observations morphologiques complémentaires nécessaires à l'interprétation des analyses ont pu être réalisées à Sbikha. D'ores et déjà des informations utiles à la gestion des ressources génétiques et des parcs à bois ont pu être apportés au niveau du GIAF, en particulier à Sbikha ou quelques problèmes de conformité pourront être résolus simplement (surgreffage d'un arbre, élimination des *Citrus volkameriana* non conformes au type d'origine). Par ailleurs, l'identification de porte-greffe adapté pour chaque région et tolérant à la salinité sera d'un grand apport pour des programmes d'amélioration d'avenir combinant à la fois des caractères de tolérance à la salinité et de résistance à la Tristeza.

Références bibliographiques

Calabrese F. 1992. The history of Citrus in the Mediterranean countries and Europe. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1 :35-38

De Vienne D., Santoni S. 1998. Les principales sources de marqueurs moléculaires. In : De Vienne D., Ed. Les marqueurs moléculaires en Génétique et Biotechnologies Végétales. Paris : INRA Editions. 1998 : 15-47

Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26:297-302.

Froelicher Y., Dambier D., Costantino G., Lotfy S., Didout C., Beaumont V., Brottier P., Risterucci A.M., Luro F. and Ollitrault P. 2006. Characterisation of microsatellite markers in *Citrus reticulata* Blanco. *Molecular Ecology Note*; submitted

Nicolosi E., Deng Z.N., Gentile A., La Malfa S., Continella G., Tribulato E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100 : 1155-1166

Perrier X., Flori A., Bonnot F. 2003. Data analysis methods. In: Hamon P., Seguin M., Perrier X., Glaszmann J. C. Eds., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science publishers. Montpellier. pp 43-76

Santoni S., Faivre-Rampant P., Prado E., Prat D. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. Ressources génétiques. *Cahiers Agricultures*. 9 : 311-27

Webber H.J. 1967. History and development of the Citrus industry. In: Reuther W., Webber H.J., Batchelor L.D. (eds) The Citrus industry, Vol 1. University of California Press, Berkeley, pp 1-39