

IDENTIFICATION ET ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DES PORTES GREFFES D'AGRUMES AUTRES QUE LES BIGARADIERS

Trifa Snoussi H^{1,2*}, Duval M.F², Belfalah Z¹ & Ollitrault P².

1: Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie. INRAT, Rue Hédi Karray, 2049, Ariana, Tunisie Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie végétales. 2: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. CIRAD, Département BIOS, UPR Multiplication végétative, Avenue Agropolis, TA A-75/02. 34398 Montpellier Cedex 5, France.

*dahliatn2000@yahoo.fr

RESUME

L'utilisation de porte-greffes est généralisée dans les systèmes de cultures agrumicoles modernes. Le bigaradier (*C. aurantium* L.) a été et probablement continue à être le porte-greffe le plus répandu et utilisé dans le monde. Malgré ses qualités multiples, les combinaisons du bigaradier avec les variétés commerciales d'oranges sont sensibles au *CTV* (*Citrus Tristeza Virus*). La propagation de ce virus tout au long du bassin méditerranéen, rend la Tunisie, encore indemne, menacée par ce fléau. L'identification et la sélection d'autres porte-greffes est d'une urgence capitale. Une prospection a été réalisée à travers tout le pays, notamment en zone saline, afin d'identifier les agrumes autres que le bigaradier qui sont utilisés comme porte-greffe ou en tant que francs de pied. Ce travail a permis la collecte de 21 accessions représentées par des orangers, des citronniers et des limettiers. Pour cette étude, neuf accessions des mêmes espèces collectées ont servi de témoins avec le bigaradier granito. La caractérisation moléculaire de ces accessions a été réalisée en utilisant 8 marqueurs microsatellites choisis sur la base de leur polymorphisme et leur stabilité. L'analyse de la diversité génétique de ce patrimoine local a permis de valoriser la variabilité et les spécificités de nos ressources, chose qui peut très bien servir aux programmes d'amélioration ou de sélection des porte-greffes d'agrumes.

Mots clés: agrumes, porte-greffe, local, bigaradier, diversité génétique, microsatellites, salinité

الملخص

تستخدم الأصول على نطاق واسع في النظم الحديثة لزراعة الحمضيات. لقد كان الأرنج (C. *aurantium* L.) و لا يزال، يعتبر الأصل الأكثر استخداما في جميع أنحاء العالم. و بالرغم من تعدد مميزاته، تعتبر تركيباته مع أصناف البرتقال التجارية، حساسة لفيروس التريستازا (*Citrus Tristeza Virus*). إن انتشار الفيروس بأحاء حوض البحر الأبيض المتوسط، يجعل من تونس، و لو سليمة، مهددة بهذه الآفة. لذا فان التعرف واختيار أصول أخرى للحمضيات يشكل مساهمة جذرية و طارئة. أجريت دراسة استقصائية في تونس، بما فيها المناطق المالحة، للتعرف على الحمضيات غير الأرنج والتي تستخدم كأصل أو غير مرقعة. وقد مكن هذا العمل من جمع 21 نوعا ممثلا في البرتقال، الليمون والليمون الحامض. تم تحليل هذه الأنواع بواسطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية وذلك باستعمال 8 مؤشرات جزيئية متبسطة ومنتخبة للحمضيات على أساس تعدد أشكالها و ثباتها. إن تحليل التنوع الجيني لهذا التراث المحلي ساعد في تعزيز تنوع وخصوصية مواردنا، وهو ما يمكن أن يستخدم في برامج تحسين وانتخاب أصول الحمضيات.

الكلمات المفاتيح: الحمضيات، أصل، محلي، أرنج، التنوع الوراثي، تقانة الميكروساتيليت، ملوحة

I- INTRODUCTION

Pendant des dizaines d'années les arbres d'agrumes se développaient comme plants de semis. Cependant, la prolongation de la période juvénile des arbres issus de semis demeure indésirable chez la plupart des agrumes. De plus, la majorité des agrumes sont sensibles aux problèmes liés au sol, dus en particulier à *phytophthora parasitica* et aux nématodes, et peuvent souvent être non-conformes au type d'origine pour quelques cultivars ayant de faibles taux d'embryonie nucellaire. Par conséquent, la plupart des vergers d'agrumes partout dans le monde se composent d'arbres à deux parties combinant les qualités favorables de la variété (scion) et du porte-greffe. La sélection de porte-greffe est une considération majeure pour n'importe quelle opération en rapport avec la croissance des agrumes. Etant donné que le porte-greffe choisi va constituer le système racinaire de la variété à greffer, ce système est responsable de l'absorption de l'eau et des nutriments, permet le stockage des sucres produits dans les feuilles et la synthèse de certains régulateurs de croissance, adapte le scion à des conditions particulières du sol et potentiellement fournit une tolérance à certaines maladies (Davies and Albrigo, 1994).

Plus de 20 caractères horticoles sont influencés par le porte-greffe incluant : la vigueur et la taille de l'arbre, la profondeur de l'enracinement, la tolérance au gel, l'adaptation à certaines conditions du sol, comme une salinité ou un pH élevé ou un excès d'eau, la résistance ou tolérance aux nématodes et aux maladies, le rendement, la taille des fruit, leur texture, leur qualité interne et leur date de maturité (Castle, 1987). De nombreux porte-greffes ont été testés et recommandés. Le Bigaradier (*C. aurantium*) étant le porte-greffe le plus employé dans le bassin méditerranéen; et presque le seul en Tunisie, bien qu'il soit tolérant à la Tristeza, il ne transmet pas cette tolérance au scion. Des porte-greffes potentiels 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 tout travail de sélection et/ou d'amélioration, une prospection a été réalisée à travers toute la Tunisie, notamment en zone saline, afin d'identifier les agrumes autres que le bigaradier qui sont utilisés comme porte-greffe ou en tant que francs de pied. Vingt et une accessions ont été collectées formées de trois espèces économiquement importantes du genre Citrus : le Citron (*C. Limon* (L.) Burm.f.), la lime (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.) et l'orange (*C. sinensis* (L.) Osb.). L'analyse de la diversité génétique de ces accessions, réalisée avec des microsatellites nucléaires, a permis de mettre en évidence la variabilité de nos ressources.

II- MATERIEL ET METHODES

2-1- Matériel végétal

Vingt et une accessions d'agrumes ayant servi comme porte-greffes ou étant utilisés en tant que francs de pieds et ont potentiellement montré une bonne adaptation, ont été collectées à partir de plusieurs régions à travers tout le pays incluant la région de production des agrumes par excellence : le Cap-Bon. Par ailleurs, La visite de certains vergers anciens ou du sud tunisien a permis la collecte de quelques porte-greffes d'agrumes remarquables, différents du bigaradier classiquement utilisé dans les autres régions agrumicoles du pays. Dans certains de ces vergers la salinité des eaux d'irrigation peut atteindre 5g/l.

Des échantillons de feuilles ont été prélevés et stockés au congélateur à -80°C.

Pour cette étude, 9 accessions des mêmes espèces collectées ont servi de témoins avec le bigaradier granito (Tableau 1). Leurs données respectives ont été ajoutées à notre analyse pour aider à mieux situer nos ressources locales au sein d'une diversité plus large d'agrumes.

Tableau 1. Les accessions témoins pour chaque espèce cultivée

Espèce	Accession témoin	Code	Origine
Citronnier (<i>Citrus limon</i> L.)	Eureka Frost	297I	Espagne
	Lisbonne/Eureka	Cit	Corse
Limettier (<i>Citrus aurantifolia</i>)	Mexicaine	Li M	Corse
	Rangpur jaune (<i>Citrus limonia</i>)	LRJ	Corse
	Cédrat (<i>Citrus medica</i>)	Céd C	Corse
	<i>Citrus volkameriana</i> (<i>Citrus limonia</i>)	CV	Corse
Oranger (<i>Citrus sinensis</i> L.)	Valencia late	Org Val	Corse
	Sanguinelli 341	34I	Espagne
Bigaradier (<i>Citrus aurantium</i>)	Sour orange Granito	B2	Corse

2-2- Extraction d'AND et marquage moléculaire

Une fois les feuilles broyées dans l'azote liquide, les ADN totaux ont été extraits en utilisant le protocole au MATAB (Risterucci *et al.*, 2000). La quantification de l'ADN a été réalisée aussi bien sur gel d'agarose 0.8% coloré au bromure d'éthidium, qu'avec le fluoroscan. Un premier travail visait le test de 20 amorces microsatellites sélectionnées (Froelicher *et al.* 2008; Luro *et al.* 2008) sur une vingtaine d'échantillons. Ceci a été suivi de l'application de 8 paires d'amorces microsatellites sur les 21 accessions collectées.

2-3- Analyse des données génétiques

Les données relatives aux accessions de référence ont été obtenues par d'autres travaux (données non encore publiées), seuls 8 couples d'amorces étaient en commun entre les deux jeux d'amorces appliqués. Ce qui nous a amené à ramener notre analyse à 8 couples d'amorces seulement. Une lecture visuelle des gels a permis de dresser la matrice qui traduit la présence de tel allèle pour tel génotype. Un indice de dissimilarité (Dice, 1945) est calculé pour chaque paire d'individus (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006). 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).

La robustesse des nœuds a été évaluée grâce aux bootstraps (500).

III- RESULTATS ET DISCUSSION

Les 8 marqueurs ont révélé des profils de bonne qualité et ont généré au total 62 allèles.

Les accessions locales ont été réparties sur trois groupes homogènes bien distincts représentant les citronniers, les limettiers et les orangers. Pour chaque espèce, ces accessions se sont montrées différentes de celles ajoutées comme références, bien que presque dans tous les cas, aussi bien les accessions locales que les références ont été regroupées dans un même groupe (Figure 1.).

Le groupe des orangers a montré des valeurs de dissimilarités faibles entre ses accessions. Ce qui traduit un lien génétique fort entre elles. Ceci a été confirmé par plusieurs études réalisées sur l'oranger (Herrero *et al.*, 1996; Fang and Roose, 1997; Luro *et al.*, 2000; Novelli *et al.*, 2006).

Le citronnier est une espèce qui a été depuis longtemps utilisée comme porte-greffe ou en tant que franc de pied dans les oasis et semble très bien s'adapter aux conditions abiotiques locales, particulièrement à la salinité, alors que dans les mêmes conditions le bigaradier montre de sévères symptômes de carence.

Les citronniers collectés ont formé un groupe bien compact, solide (bootstrap= 92%) et homogène, traduisant un lien entre eux encore plus étroit que celui remarqué entre les orangers. Il faut dire qu'aussi bien la distribution géographique que le mode de propagation végétative (marcottage) de ces citronniers, ont beaucoup contribué à ce résultat.

La lime 195 est retrouvée au sein du groupe des citronniers, elle partage 14 allèles sur tous les 8 marqueurs avec les citronniers, 5 allèles seulement avec les limes "Chiiri" et 8 allèles avec les limes douces. C'est pour cela que cet échantillon est appelé lime alors qu'il ressemble beaucoup à un citronnier. Un apport informatif sur la morphologie de cette accession serait utile pour confirmer son attribution. Les limes ont depuis longtemps été utilisées comme porte-greffes dans le sud tunisien. La lime "Chiiri" étant la variété la plus populaire et la plus répandue dans la région, surtout dans les oasis. Les agriculteurs de la région sont tous d'accord sur son excellent pouvoir d'adaptation aux conditions locales, principalement le manque d'eau et la salinité.

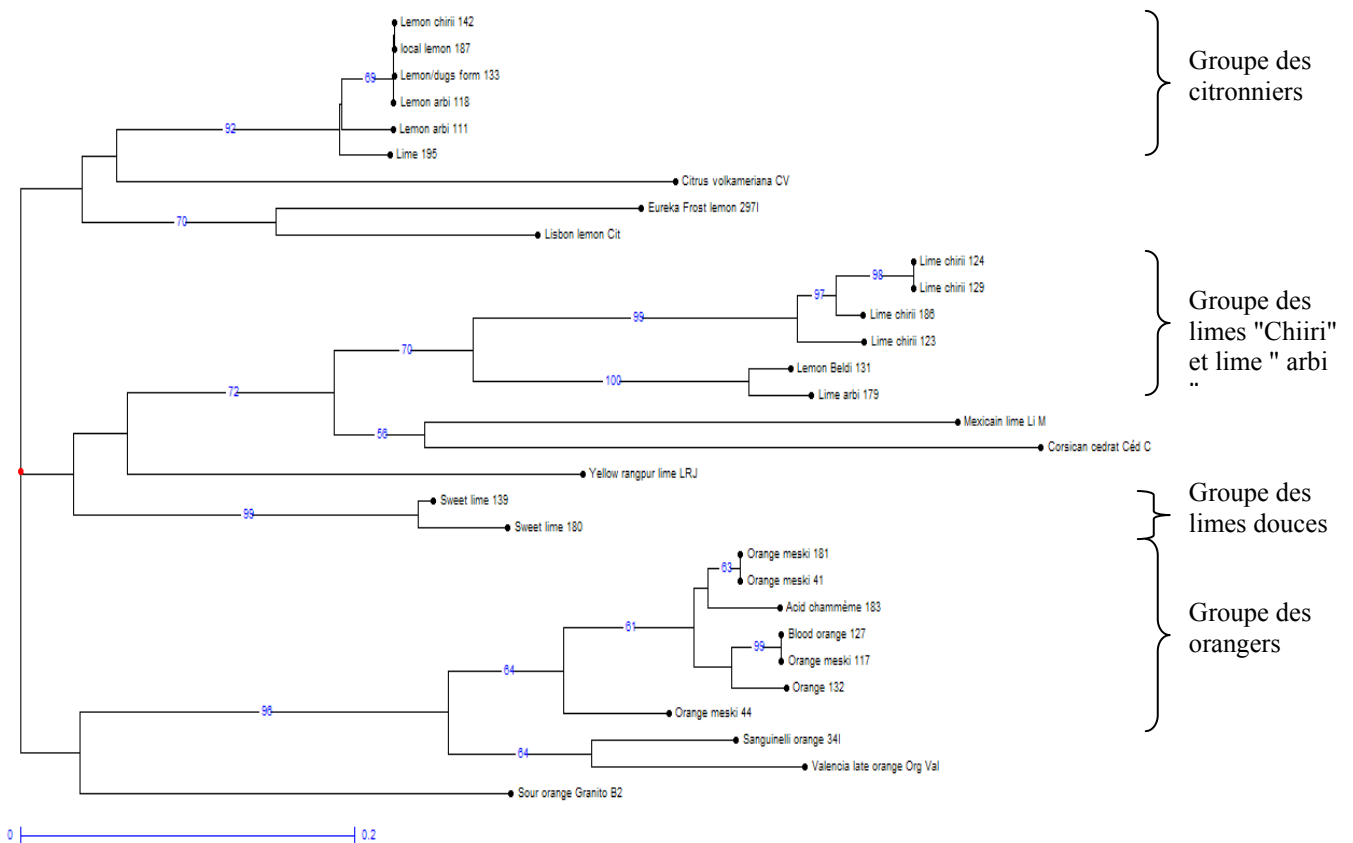


Figure 1. Représentation hiérarchique selon la méthode NJtree, réalisée sur une matrice de dissimilarités entre 21 accessions d'agrumes tunisiens avec les 9 accessions de référence.

Ces limes "Chiiri" collectées constituent des génotypes uniques qui se regroupent toujours ensemble (bootstrap= 99%). Cependant le groupe des limes n'est pas homogène, dans le sens où il est scindé en deux sous groupes, le sous groupe des limes "Chiiri" distant d'un autre sous groupe constitué de la lime "arbi" et du citronnier "beldi", et le sous groupe des limes douces.

Le citronnier "beldi" présente de petits fruits de couleur verte virant au jaune pâle avec une forme arrondie. Le fruit ressemble à celui de la lime "arbi" appelée aussi lime "beldi". Le jus est très acide et aromatisé, c'est ce qui a fait que les agriculteurs utilisent le terme citron pour désigner cette lime. La représentation hiérarchique des accessions collectées (Figure 1) montre bien que les limes "Chiiri" sont bien différentes des autres limes : "arbi" et douces. Les accessions de références utilisées avaient aussi pour but de nous orienter sur la question d'origine de ces limes "Chiiri". Il est clair que pour cette étude, les limes mexicaine, rangpur jaune et cédrat sont plus proches des limes "Chiiri" que des limes douces. Plus d'investigation sur ces génotypes sera d'un grand apport informatif pour trouver une explication quant à l'origine des limes "Chiiri".

Les limes douces 139 et 180 collectées respectivement de Gafsa et Tozeur, sont utilisées comme franc de pied. Elles présentent respectivement 7 et 8 allèles spécifiques au bigaradier granito de référence, et seulement 4 et 3 allèles spécifiques aux limes. Suite à ce résultat, nous suggérons que le bigaradier soit un des parents des limes douces.

IV- Conclusion et perspectives

Ce travail a mis en évidence la variabilité génétique entre porte-greffes d'agrumes locaux autres que le bigaradier. Il est clair qu'à côté de cette diversité, un polymorphisme morphologique intervariétal demeure important au sein des orangers, des citronniers et des limettiers. Ce polymorphisme est le résultat de beaucoup de facteurs comme les mutations, les hybridations et la sélection humaine. La diversité intraspécifique doit être valorisée en commençant par la conservation des ressources génétiques locales de chacune de ces espèces en s'appuyant sur la constitution de collections de génotypes (Ollitrault *et al.*, 1999). Ces collections serviront aux agrumiculteurs en leur proposant une plus large diversité adaptative et morphophysologique des cultivars aux différentes régions de production. L'impact pratique de ce travail est d'aider à la gestion des collections tunisiennes de porte-greffes qui sont distribués aux pépiniéristes et aux agrumiculteurs. 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. Par ailleurs, la conservation de certaines accessions qui paraissent intéressantes comme le citronnier "arbi" et la lime "Chiiri" semble essentielle, en particulier pour les tolérances aux facteurs abiotiques qu'elles peuvent apporter dans l'amélioration des porte-greffes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Castle W.S. 1987.** Citrus rootstocks. *In*: Rom. R.C. and Carlson. R.F. (eds). *Rootstocks for Fruit Crops*. John Wiley and Sons, New York, pp. 361-399.
- Davies, F.S., and Albrigo, L.G. 1994.** Citrus. CAB International, Wallingford, UK.
- Dice, L. R. 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26:297-302.
- Fang, D.Q., and Roose, M.L. 1997.** Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95:408-417.
- Froelicher, Y., Dambier, D., Bassene, J.B., Costantino, G., Lotfy, S., Didout, C., Beaumont, V., Brottier, P., Risterucci, A.M., Luro, F., and Ollitrault, P. 2008.** Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Resources*, 8: 119-122. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01893.x

- Herrero, R., Asíns, M.J., Carbonell, E.A., and Navarro, L. 1996.** Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 92:599-609. doi: 10.1007/BF00224564.
- Luro, F., Rist, D., and Ollitrault, P. 2000.** Sequence tagged microsatellites polymorphism: an alternative tool for cultivar identification and evaluation of genetic relationship in *Citrus*. Paper presented at the 9th Congress of the International Society of Citriculture (ISC), Orlando, United States, 3-7 December 2000.
- Luro, F., Costantino, G., Terol, J., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., Talon, M., Ollitrault, P., and Morillon, R. 2008.** Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics*, 9:287. doi:10.1186/1471-2164-9-287.
- Novelli, V.M., Cristofani, M., Souza, A.A., and Machado, M.A. 2006.** Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Genetics and Molecular Biology*, 29(1): 90-96.
- Ollitrault, P., Jacquemond, C., Dubois, C., Luro, F. 1999.** Citrus. *In: Genetic diversity of cultivated tropical plants*. P. Hamon, M. Seguin, X. Perrier, J.C. Glaszmann (eds.). Enfield, Science Publishers. Montpellier. pp. 89-111.
- 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.
- Perrier, X., and Jacquemoud-Collet, J.P. 2006.** DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Risterucci, A. M., Grivet L., N'Goran J. a. K., Pieretti I, Flament M.H., Lanaud C. 2000.** A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L." *Theoretical and Applied Genetics* 101(5 - 6): 948 - 955.