



**Université des Antilles**  
**École doctorale n° 589 – Milieu insulaire tropical à risques**

**Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR**

**Soutenue publiquement par**

**SIVAGER Gary**

Le 29 Avril 2022

**Identification des déterminants physiologiques et moléculaires à l'origine de la réponse différentielle d'agrumes diploïdes et polyploïdes vis-à-vis de la maladie du Huanglongbing (HLB)**

**Thèse soutenue publiquement devant le jury composé de :**

<b>M. MORILLON Raphaël</b>	Directeur de recherche, CIRAD	Directeur de thèse
<b>M. GROS Olivier</b>	Professeur, Université des Antilles	Co-directeur de thèse
<b>Mme PRAT-LEONHARDT Nathalie</b>	Directrice de recherche, CEA	Rapporteur
<b>M. GALAUD Jean-Philippe</b>	Professeur, Université Paul Sabatier	Rapporteur
<b>Mme TONIUTTI Lucile</b>	Chercheur, CIRAD	Examinatrice
<b>Mme HUFNAGEL Bárbara</b>	Chercheur, CIRAD	Examinatrice

# REMERCIEMENTS

*Les travaux de thèses présentés dans ce manuscrit ont été effectués au sein du CIRAD de Guadeloupe (Station de Roujol à Petit-Bourg, Station de Capesterre-Belle-Eau et Station de Duclos), à l'Université des Antilles dans le Laboratoire C3MAG ainsi que COVACHIM. Je remercie la Collectivité Territoriale de Martinique d'avoir financé mes travaux de thèse, ainsi que l'École Doctorale 589 de l'Université des Antilles.*

*Dans un premier lieu, j'aimerais remercier le Directeur Régional du CIRAD Antilles-Guyane, MARTINEZ Dominique, pour m'avoir permis de réaliser toute la durée de ma thèse au sein du CIRAD de Guadeloupe.*

*Je remercie le Docteur MORILLON Raphaël, mon directeur de thèse de m'avoir accueilli au sein de l'équipe SEAPAG. Je lui adresse ces remerciements pour sa bienveillance et sa détermination tout au long de ces années de thèse. Je le remercie pour l'implication dont il a fait part et pour tous ses élans de motivation dans tous les moments difficiles que j'ai pu rencontrer. Merci pour ton apport pédagogique, tes connaissances scientifiques, ta disponibilité, ton aide tout au long de cette thèse et notamment la correction de ce manuscrit et les différents articles publiés et soumis. Merci !*

*Je remercie également le Professeur GROS Olivier, mon co-directeur de thèse, de m'avoir aidé notamment pour les aspects de microscopie et corrections qu'il a pu m'apporter concernant le résultat de mes données. Merci pour la disponibilité, le soutien, les différents encouragements et les voies possibles concernant mon projet professionnel. Je le remercie également pour les différentes démarches dont il a pu me faire part afin de pouvoir apporter mon savoir aux étudiants en faisant des vacances à l'UFR Sciences Exactes et Naturelles au Campus de Fouillole de l'Université des Antilles – Pôle Guadeloupe.*

*Je tiens à remercier l'ensemble de mon comité de pilotage, le Pr. DRIOUICH Azzedine, le Dr. SANTINI Jérémi, le Dr. CORMIER Fabien, le Dr. BRAT Pierre et mes deux directeurs pour l'intérêt envers mon travail, les différentes corrections, pour les orientations à prendre durant ces années de thèse. J'apporte une attention au Pr. DRIOUICH et le remercie de m'avoir pris en stage dans le laboratoire GlycoMEV à l'Université de ROUEN. Merci pour*

*l'opportunité et les différents conseils reçus.*

*Je remercie le Dr. INAMO-VATIN Magalie de m'avoir pris sous son aile et de m'avoir fait confiance pour les différents enseignements que j'ai pu effectuer aux étudiants de Licence 1 et 3 ainsi qu'au Master 1 de Biologie-Santé à l'Université des Antilles.*

*Ayant été principalement à la Station de Roujol, je tiens à remercier non seulement l'ensemble de l'équipe agrumes de la station (BRUYÈRE Saturnin, BOISNE-NOC Rosiane et tous les techniciens terrain), je remercie également l'ensemble du personnel de la station de Roujol qui comprend l'équipe Ignose mais aussi le personnel du Centre de Ressources Biologiques et celui de l'Institut Technique et Tropical. Je remercie également les membres de mon Comité de Suivi Individuel, le Dr. CEBRIAN-TORREJON Gerardo, le Dr. FERDINAND Sandrine et ROUX-CUVILLIER Michel.*

*Je remercie également MIRANDA Maëva pour la réalisation des banques RNAseq, DEREPPER Alexis pour l'aide apportée lors des analyses en bioinformatique et également le Dr. HUFNAGEL Bárbara et le Dr. OLLITRAULT Patrick pour leur aide lors de la relecture de mes travaux.*

*J'apporte une attention particulière à ANDYPAIN Sandrine, technicienne de laboratoire au CIRAD de Capesterre-Belle-Eau pour sa disponibilité, son aide lors des différentes analyses biochimiques. Merci pour tout le temps dont tu as pu me faire part, de ta bienveillance, ta bonne humeur et ta grande sympathie toutes les fois où j'ai dû venir au laboratoire réaliser mes diverses expériences.*

*Je tiens à remercier grandement deux individus qui ont rythmé ces années de thèse. Tout d'abord, je remercie HEUGUET Benoît, ancien VSC dans l'équipe agrumes, qui m'a apporté les différentes connaissances, son savoir-faire dans ce monde végétal mais aussi pour sa bonne humeur et son savoir-être. Je remercie ensuite, mon collègue doctorant CALVEZ Lény, qui, je sais, ira loin dans le monde de la recherche. Merci pour l'aide, le soutien, les encouragements, ton humeur, le travail d'équipe durant ces différentes années. Merci à vous deux et également LAURENT Lévy (IT2) pour la bonne humeur et les repas organisés afin que l'on puisse tous décompresser.*

*Je remercie les différents stagiaires que j'ai pu avoir et avec qui j'ai eu le plaisir de*

*travailler, UGOLIN Magalie, FILLON Inès, MONDÉLICE François-Xavier, MORINO Elsa et MISANTROPE Mélanie. Merci d'avoir joué le jeu et d'avoir montré votre envie tout au long de vos périodes de stage. Je n'oublie pas les bons petits plats lors de vos pots de départs et tous les échanges que l'on a pu avoir.*

*D'un point de vue plus personnel, je remercie ma mère qui m'a soutenue pendant toutes ces années d'études et qui m'a encore soutenu dans cette envie de réaliser un doctorat en biologie. Merci pour tout ce grand soutien, ton amour et toute l'éducation que tu as pu m'apporter afin de faire face aux différents aspects de la vie pour pouvoir relever la tête quel que soit la situation. Merci de me faire confiance dans mes choix. Tu ne seras pas déçue. Je remercie également mes sœurs pour le soutien et plus particulièrement ma sœur cadette qui a toujours été là pour moi, dans les bons comme les mauvais moments.*

*Je remercie également mes amis Alexandre, Fanny, Stessie, Ludivine, Marie-Andrée, Alicia, Laura, mais aussi ceux de l'île sœur, Stanley, Maria et Émilie qui m'ont dit de ne jamais lâcher l'affaire même dans les moments de doute. J'appuie mes remerciements pour Stanley qui est devenu mon meilleur ami guadeloupéen, sans qui la vie aurait pu être bien fade. Merci pour tout ! Je remercie également mon ancienne propriétaire, Fanny, qui est devenue une amie sans faille et à qui j'ai pu me confier et qui a su me conseiller et surtout m'épauler quand ça n'allait pas. Merci pour tous ces moments où l'on a pu échanger, regarder des séries et rigoler, rigoler et encore rigoler. Merci.*

*Enfin, mes derniers remerciements vont tout simplement à tous ceux qui ont pu m'aider, me conseiller, m'épauler, m'encourager de près comme de loin. Merci pour votre attention, votre apport, votre disponibilité, votre savoir-faire et savoir-être mais aussi tous ces moments de joie dont je serai éternellement reconnaissant.*

*Merci pour tout !*



# ***TABLE DES MATIÈRES***

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....</b>	<b>10</b>
<b>FIGURES ET TABLEAUX.....</b>	<b>12</b>
<b>1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. Les agrumes .....</b>	<b>17</b>
1.1.1. Origine et diffusion.....	17
1.1.2. Taxonomie des agrumes.....	18
1.1.3. Les porte-greffes.....	19
1.1.4. Contexte économique.....	21
<b>1.1. Polyploïdie.....</b>	<b>23</b>
1.1.1. Généralités.....	23
1.1.2. Impact de la polyploïdie chez les agrumes.....	26
<b>1.2. Mécanisme de défense de la plante .....</b>	<b>29</b>
1.2.1. Le stress oxydant .....	29
1.2.1.1. <i>Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)</i> .....	30
1.2.1.2. <i>Mécanisme de défense antioxydant</i> .....	32
1.2.2. Réaction d'hypersensibilité (HR) et réaction systémique acquise (SAR) .....	35
1.2.3. Acide jasmonique (JA) et éthylène (ET).....	38
1.2.4. Acide abscissique (ABA).....	38
<b>1.3. Le Huanglongbing .....</b>	<b>39</b>
1.3.1. Histoire et origine .....	39
1.3.2. Agents pathogènes et vecteurs de la maladie du Huanglongbing .....	40
1.3.3. Stratégie de lutte contre le HLB .....	41
1.3.3.1. <i>Lutte chimique</i> .....	42

1.3.3.2.	<i>Lutte biologique</i> .....	42
1.3.3.3.	<i>Implication du génome dans la réponse au Huanglongbing</i> .....	43
1.3.4.	Symptômes de la maladie .....	44
1.3.4.1.	<i>Impact de la maladie du Huanglongbing au niveau foliaire</i> .....	45
1.3.4.2.	<i>Impact du Huanglongbing sur les fruits</i> .....	47
1.3.4.3.	<i>Impact du Huanglongbing sur le massif racinaire</i> .....	48
<b>PROBLÉMATIQUE</b> .....		<b>50</b>
<b>2. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....		<b>55</b>
2.1.	<b>Matériel végétal</b> .....	<b>56</b>
2.2.	<b>Technique Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)</b> .....	<b>56</b>
2.3.	<b>Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)</b> .....	<b>57</b>
2.4.	<b>Analyses comportement physiologique sur pétioles de limettier Mexicain 2x et limettier Tahiti 3x</b> .....	<b>57</b>
2.5.	<b>Microscopie Électronique à Balayage (MEB) sur pétioles de limettiers Mexicain 2x ; limettier Tahiti 3x ; racines de Citrumelo Swingle 2x et 4x</b> .....	<b>57</b>
2.6.	<b>Coloration au bleu d'aniline sur pétioles de limettiers Mexicain 2x ; limettier Tahiti 3x ; racines de Citrumelo Swingle 2x et 4x</b> .....	<b>58</b>
2.7.	<b>Dosages biochimiques sur pétioles 2x et 3x</b> .....	<b>58</b>
2.7.1.	Malonaldéhyde (MDA), indicateur de la peroxydation des lipides .....	58
2.7.2.	Peroxyde de dihydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), indicateur de stress oxydatif .....	58
2.7.3.	Catalase (CAT), enzyme du système antioxydant .....	58
2.7.4.	Ascorbate peroxydase (APX), enzyme du système antioxydant .....	59
2.7.5.	Ascorbate total (AsA), antioxydant .....	59
2.7.6.	Dosage de l'amidon .....	59
2.8.	<b>Dosages des composés phénoliques et analyse électrochimique sur racines de Citrumelo Swingle 2x et 4x</b> .....	<b>59</b>
2.9.	<b>Hybridation in situ à fluorescence (FISH) sur racines de Citrumelo 2x et 4x</b> ..	<b>60</b>
2.10.	<b>Extraction d'ARN sur pétioles feuilles de limettiers 2x et 3x et sur racines de</b>	

<b>Citrumelo 2x et 4x, création de banque et analyse RNAseq .....</b>	<b>60</b>
2.10.1. Isolation de l'ADN total, préparation d'ADNc et séquençage.....	60
2.10.2. <i>Traitement des données RNAseq.....</i>	<i>60</i>
2.10.3. <i>Analyse d'expression différentielle et catégorisation fonctionnelle .....</i>	<i>61</i>
2.10.4. <i>Analyse de réseaux de gènes .....</i>	<i>61</i>
<b>2.11. Analyse hormonale de feuilles de limettiers Mexicain 2x, Tahiti 3x et sur racines de porte-greffes citrumelo 2x et 4x.....</b>	<b>62</b>
<b>3. Chapitre 1 : Specific Physiological and Anatomical Traits Associated With Polyploidy and Better Detoxification Processes Contribute to Improved Huanglongbing Tolerance of the Persian Lime Compared With the Mexican Lime .....</b>	<b>63</b>
<b>3.1. Résumé.....</b>	<b>64</b>
<b>3.1. Article.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2. Données complémentaires : analyses des composés de parois cellulaires de feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti.....</b>	<b>82</b>
3.2.1. La paroi végétale.....	82
3.2.1.1. <i>Les pectines.....</i>	<i>82</i>
3.2.1.2. <i>Les hémicelluloses.....</i>	<i>83</i>
3.2.2. Matériels et Méthodes.....	84
3.2.3. Résultats et analyses des composés de paroi cellulaires chez les feuilles de limettier Mexicain et Tahiti .....	84
3.2.3.1. <i>Analyse des fractions enrichies en pectines.....</i>	<i>84</i>
3.2.3.2. <i>Analyse des fractions enrichies en hémicelluloses .....</i>	<i>85</i>
3.2.4. Conclusion.....	90
<b>4. Chapitre 2 : Better tolerance to Huanglongbing is conferred by tetraploid citrumelo rootstock and is influenced by the ploidy of the scion</b>	<b>91</b>
<b>4.1. Résumé.....</b>	<b>92</b>
<b>4.2. Article.....</b>	<b>94</b>

<b>5. Chapitre 3 : L'expression des génomes des agrumes polyploïdes est-elle à l'origine de leur meilleure tolérance face au HLB par rapport aux diploïdes ? .....</b>	<b>128</b>
<b>5.1. Contexte .....</b>	<b>129</b>
<b>5.2. Résultats.....</b>	<b>129</b>
5.2.1. Analyse RNAseq .....	129
5.2.1.1. Analyse générale.....	129
5.2.1.2. Analyse subjective de gènes impliqués dans le développement et la défense des plantes	132
5.2.1.3. Création de réseaux de gènes issus des feuilles de limettiers 2x et 3x et des racines de porte-greffes 2x et 4x.....	135
5.2.2. Résultats des dosages hormonaux.....	140
5.2.2.1. Résultats de dosage de phytohormones au niveau des greffons de limettiers diploïdes et triploïdes .....	141
5.2.2.2. Résultats des dosages de phytohormones au niveau des racines de porte-greffes diploïdes et tétraploïdes .....	143
5.2.3. Résultats du métabolome .....	146
5.3. Discussion .....	148
5.4. Conclusion.....	152
<b>6. CONCLUSION GÉNÉRALE &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>153</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>162</b>
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>163</b>
<b>Annexe 2 .....</b>	<b>164</b>
<b>Annexe 3 .....</b>	<b>165</b>
<b>7. ENCADREMENTS .....</b>	<b>166</b>
<b>7.1. Encadrements de stagiaires.....</b>	<b>167</b>
<b>7.2. Enseignements vacataires.....</b>	<b>168</b>

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 169**

# LISTE DES ABBRÉVIATIONS

**•OH** : radical hydroxyle

**2x / 3x / 4x** : di- / tri- / tétraploïde

## A

**ABA** : acide abscissique

**ACP** : psylle asiatique des agrumes

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**APX** : ascorbate peroxydase

**Ara** : arabinose

**AsA** : acide ascorbique / ascorbate

**ASN** : asparagine

## C

**C3MAG** : Centre Commun de Caractérisation des Matériaux des Antilles et de la Guyane

**CAT** : catalase

**Cu** : Cuivre

**Cis-ZR** : cis zeatine-ribose

**Cit** : Citrumelo

**CTV** : virus de la tristeza

## E

**ET** : éthylène

**ETI** : Effector-Triggered Immunity

## F

**FDR** : First Division Restitution

**Fe** : fer

**Fe<sup>2+</sup>** : ion ferreux

**FISH** : Hybridation in situ à fluorescence

## G

**GABA** : acide gamma-aminobutyrique

**Gal** : galactose

**GalA** : acide galacturonique

**GDE** : gènes différenciellement exprimés

**Glc** : glucose

**GO** : gene ontology

**GSH** : glutathion

## H

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**HCi** : hémicelluloses insolubles

**HCS** : hémicelluloses solubles

**HLB** : Huanglongbing

**HR** : réaction d'hypersensibilité

## I

**IPR** : adenine-riboside

## J

**JA** : acide jasmonique

## L

**Laf / Lam / Las** : Candidatus Liberibacter africanus / - americanus / - asiaticus

**Las+** : infecté par Las

**Las+AS** : asymptomatique / stade précoce

**Las+S** : symptomatique / stade tardif

**Las+T** : témoin

**LM** : limettier Mexicain

**LOX** : lipoxygénase

**LT** : limettier Tahiti (Persian lime en anglais)

## M

**MDA** : malondialdéhyde

**MEB** : microscopie électronique à balayage

**miRNA** : microRNA

**Mt** : milliers de tonnes

## N

**NPR1** : Non-expressor of Pathogenesis-Related

## O

**O<sub>2</sub>** : dioxygène

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : anion superoxyde

## P

**PAD4** :

**PAMP** : Pathogen-associated Molecular Pattern

**PCR** : réaction en chaîne par polymérase

**Pro** : proline

**PTI** : PAMP-Triggered Immunity

## Q

**qPCR** : réaction en chaîne par polymérase quantitative

**R**

**Rha** : rhamnose

**ROS** : reactive oxygene species

**S**

**SA** : acide salicylique

**SAR** : résistance systémique acquise

**SDR** : Second Division Destitution

**T**

**TGA** : facteurs de transcriptions TGA

**U**

**USA** : États-Unis d'Amérique

**V**

**vs** : versus

**W**

**WRKY** : facteurs de transcription WRKY

**X**

**Xyl** : xylose

**Z**

**Zn** : zinc

# FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 - Carte de l'expansion des agrumes dans le monde (Curk, Luro, & Ollitrault, 2019)	18
Figure 2 - Origines phylogénétiques des agrumes cultivés (F. Curk, P. Ollitrault, CIRAD)...	19
Figure 3 - Évolution de la production (en milliers de tonnes) d'agrumes cultivés dans le bassin caribéen entre 2008 et 2016 (FAO, 2017).....	22
Figure 4 - Les différents types de polyploïdes (Thèse Julie Oustirc d'après Chen, 2007).....	24
Figure 5 - Conséquences de la FDR et SDR lors de la méiose (Thèse Julie Oustric d'après Bretagnolle & Thompson, 1995).....	26
Figure 6 - Microscopie de tige 2x (A), 4x (B) et de racines 2x (C) et 4x (D) (Allario et al., 2011) .....	27
Figure 7 - Comportement d'une variété d'orange greffées avec un porte-greffes (limettier Rangpur) 2x et 4x après un déficit hydrique de 11 jours (Allario et al., 2013).....	29
Figure 8 - Effet des ROS sur l'arbre d'après Krishnamurthy & Rathinasabapathi, (2013). Flèches rouges : effets négatifs ; flèches vertes : effets positifs.....	31
Figure 9 - Mécanisme de défense : Réaction d'Hypersensibilité (HR) et Résistance Systémique Acquise (SAR), d'après Dutt et al., (2015).....	37
Figure 10 - Diaphorina citri au stage adulte (A) (Cadwell, (1998)) et Trioza erytreae au stage adulte (B) (Gobierno de Canarias).....	41
Figure 11 - Larve de psylle de <i>D. citri</i> (gauche) parasitée par <i>T. radiata</i> (droite) origine photo ? .....	42
Figure 12 - Dépôt de callose (flèche noire) au niveau des pores (flèche blanche) des cellules cribles du phloème (Koh et al.,2012).....	44
Figure 13 – Différence physiologique au niveau des cellules du phloème entre plants infectés (Las+) ou non (Las-) par Las.....	45
Figure 14 - Symptômes foliaires induits par le HLB (a) ou par une carence en métaux (b) ...	46
Figure 15 - Zone verte sur un fruit d'agrumes infecté par Las (A). Coupe interne d'un fruit infecté par Las (B). Flèches blanches : verdissement ; flèches rouges : graines avortées ; flèche jaune : couleur jaunâtre au niveau de la columelle, flèche bleue : axe courbé.....	47
Figure 16 - Racines infectées (B) ou non (A) par Las .....	49
Figure 17 – Résidus de monomères d'acide galacturonique liés en $\alpha$ -(1,4) .....	83
Figure 18 – Impact du HLB sur la composition en monosaccharides des fractions enrichies en pectines dans les feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti. Les proportions en monosaccharides	



ont été obtenues par analyse GC-FID. Les barres noires représentent la variété diploïde (limettier Mexicain 2x) et les blanches, la variété triploïde (limettier Tahiti 3x). Les moyennes des valeurs ont été obtenues avec trois réplifications biologiques et une réplification technique. Des tests ANOVA et Turkey ont permis d'indiquer s'il y avait une différence significative entre les variétés et une différence au cours de la maladie. La significativité est représentée par des lettres différentes..... 85

Figure 19 – Impact du HLB sur la composition en monosaccharides des fractions enrichies en hémicelluloses dans les feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti. Les proportions en monosaccharides ont été obtenues par analyse GC-FID. Les barres noires représentent la variété diploïde (limettier Mexicain 2x) et les blanches, la variété triploïde (limettier Tahiti 3x). Les moyennes des valeurs ont été obtenues avec trois réplifications biologiques et une réplification technique. Des tests ANOVA et Turkey ont permis d'indiquer s'il y avait une différence significative entre les variétés et une différence au cours de la maladie. La significativité est représentée par des lettres différentes. .... 86

Figure 20 - Impact du HLB sur la composition en monosaccharides des fractions enrichies en hémicelluloses insolubles dans les feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti. Les proportions en monosaccharides ont été obtenues par analyse GC-FID. Les barres noires représentent la variété diploïde (limettier Mexicain 2x) et les blanches, la variété triploïde (limettier Tahiti 3x). Les moyennes des valeurs ont été obtenues avec trois réplifications biologiques et une réplification technique. Des tests ANOVA et Turkey ont permis d'indiquer s'il y avait une différence significative entre les variétés et une différence au cours de la maladie. La significativité est représentée par des lettres différentes. .... 89

Figure 21 - Diagramme de Venn pour les feuilles (A) de greffons de limettiers 2x et 3x et pour les racines de porte-greffes Citrumelo 2x et 4x..... 130

Figure 22 - Catégorisation fonctionnelle de gènes différentiellement exprimés d'une comparaison entre plants infectés ou non par Las ..... 131

Figure 23 - Cluster "Turquoise" obtenu sous R de feuilles de limettiers 2x et 3x greffés respectivement avec un porte-greffe citrumelo 2x et 4x en condition malade (orange ; Las+) et témoin (bleu ; Las-). .... 135

Figure 24 – Réseau de gènes surexprimés après analyse de feuilles de limettier Tahiti greffé avec citrumelo 2x en comparant la condition malade par rapport à celle témoin dans le cluster Turquoise. Les cercles colorés indiquent l'intensité de la surexpression. .... 136

Figure 25 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de feuilles de limettier Mexicain greffé avec citrumelo 4x et citrumelo 2x en condition malade dans le cluster Turquoise. Les cercles

colorés indiquent l'intensité de la surexpression. ....	137
Figure 26 - Cluster "Magenta" obtenu sous R de feuilles de limettiers 2x et 3x greffés respectivement avec un porte-greffe citrumelo 2x et 4x en condition infecté (orange ; Las+) et témoin (bleu ; Las-). ....	137
Figure 27 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de feuilles de limettier Tahiti greffé avec citrumelo 2x en comparant la condition infecté par rapport à celle témoin dans le cluster Magenta. Les cercles colorés indiquent l'intensité de la surexpression.....	138
Figure 28 - Cluster "Brown" obtenu sous R de racines de porte-greffes 2x et 4x greffés respectivement avec des limettiers 2x et 3x en condition malade (orange ; Las+) et témoin (bleu ; Las-). ....	138
Figure 29 - Réseau de gènes sous-exprimés après analyse de racines de porte-greffe citrumelo 2x greffé avec LT 3x et LM 2x en comparant la condition infecté dans le cluster Brown. Les cercles colorés indiquent sur l'intensité de la sous-expression. ....	139
Figure 30 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de racines de porte-greffe citrumelo 2x greffé avec LT 3x et LM 2x en comparant la condition dans le cluster Brown. Les cercles colorés indiquent l'intensité de la surexpression. ....	140
Figure 31 - Dosages des hormones ABA, Cis.ZR, IPR, JA et SA dans les feuilles de limettiers Mexicain 2x et Tahiti 3x HLB+ ou HLB- greffés respectivement avec des porte-greffes Citrumelo 2x et 4x. ....	143
Figure 32 - Dosages des hormones ABA, Cis.ZR, IPR, JA et SA dans les racines de porte-greffes Citrumelo 2x et 4x greffés respectivement avec des limettiers Mexicain 2x et Tahiti 3x HLB+ et HLB-. ....	146
Figure 33 - Spectre visuel de feuilles de greffons infectés (courbe bleue) ou non (courbe rouge) par le HLB. Couleur inversée dans le graphe pour GABA. ....	147
Figure 34 - Résumé des résultats du métabolome greffons 2x (A) et 3x (B) en fonction de l'infection à la maladie (rouge), l'interaction greffon/porte-greffe (vert) et de la ploïdie du porte-greffe (bleu). ....	147
Figure 35 - Impact du HLB (Las+) ou non (Las-) sur au niveau des pores du phloème de pétioles de feuilles ou de racines diploïdes ou polyploïdes entraînant des conséquences externes ....	161
Figure 36 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de racines de porte-greffe citrumelo 2x greffé avec LT 3x et LM 2x en condition témoin dans le cluster Brown. Les cercles colorés indiquent sur l'intensité de la sous-expression. ....	163
Figure 37 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de racines de porte-greffe citrumelo 4x greffé avec LT 3x et LM 2x en condition témoin dans le cluster Brown. Les cercles colorés	

indiquent sur l'intensité de la sous-expression ..... 164

Figure 38 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de racines de porte-greffes citrumelo 4x et 2x greffé avec le limettier 2x en condition témoin. Les cercles colorés indiquent sur l'intensité de la surexpression..... 165

Tableau 1 - Rendement total des monomères de sucres analysés par GC-FID chez les fractions de pectines, hémicelluloses solubles (HCs) et insolubles (HCi) présentes chez les feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti. Le rendement a été fait à partir de la masse totale initiale prise pour faire la GC-FID et la masse totale analysée après GC-FID pour chaque échantillon. Une moyenne de ces rendements a été faite afin d'obtenir le rendement total par variété chez les différentes fractions. Pour chaque fraction, LM et LT représentent la totalité des conditions (témoin, asymptomatique et symptomatique) et des répétitions prises en compte..... 90

Tableau 2 – Impact du HLB et de la polyploïdie sur l'expression de certains gènes intervenant dans le développement et la défense des plantes. L'expression de chaque gène est indépendante et ne signifie pas qu'un même nombre de signes + confère une expression de la même importance. + : présence d'expression de gènes et - : une absence d'expression ; les colonnes grises : les plants infectés (Las+) et les blanches : les plants témoins (Las-) ; les signes noirs : expression chez les plants diploïdes et les signes rouges : expressions chez les plants polyploïdes. .... 132

# ***1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE***

## 1.1. Les agrumes

### 1.1.1. Origine et diffusion

Les agrumes – dérivant du latin médiéval *acrumen* – ou encore « *citrus* » pour les Anglais et son dérivé « *cítricos* » pour les Espagnols (Ollitrault, Desmaret, & Griffon, 2000) représentent principalement les fruits acides (Couplan, 2012). Ce sont généralement des arbres de petite taille pouvant varier de 4 à 12m de haut. Leur feuillage peut être trifolié ou monofolié en fonction du genre auquel ils appartiennent.

L'origine géographique des agrumes est très controversée (Wu et al., 2018). Ils seraient originaire des régions tropicales et subtropicales d'Asie (Webber, 1967). Les mouvements humains vont les répartir dans les autres régions propices à leur croissance. Dans le bassin méditerranéen, le cédratier (*Citrus medica* L.) est le premier agrume importé au III<sup>ème</sup> siècle av. JC, sûrement par l'armée d'Alexandre le Grand. Il sera utilisé en pharmacutique, en cosmétique et sert d'arbre ornemental. Puis entre le X<sup>ème</sup> et XII<sup>ème</sup> siècle dans le bassin méditerranéen, les Portugais et les Génois auraient introduit d'autres agrumes tels que le bigaradier, les orangers et les citronniers. Des écrits décrivant ces agrumes ont été retrouvés en Espagne à cette période. Les premières cultures d'oranges sont apparues en Europe au cours du 15<sup>ème</sup> siècle. Les mandarines sont, quant à elles, arrivées plus tard au cours du 19<sup>ème</sup> siècle (Ollitrault & Navarro, 2012). Aujourd'hui le bassin méditerranéen est devenu une zone importante de la production d'agrumes frais. En 1493, Christophe Colomb introduira dans la Caraïbe de nombreuses graines d'agrumes, elles seront ensuite réparties aux États-Unis d'Amérique (USA), Brésil et le reste de l'Amérique (Camille Jacquemond et al., 2013). En Afrique, l'apparition des agrumes a été plus tardive. En effet, ils ont été introduits par les portugais en Afrique de l'Ouest au 17<sup>ème</sup> siècle. En parallèle, les hollandais les ont importés en Afrique du Sud. Les premiers citrons et oranges ont été transportés du Brésil vers l'Australie en 1769 par les colons (**figure 1**).

Aujourd'hui, les cultures d'agrumes sont concentrées sur une étendue géographique comprise entre le 44<sup>ème</sup> parallèle Nord et le 40<sup>ème</sup> parallèle Sud, le climat adéquat étant tropical ou tempéré (Janick, 2005).

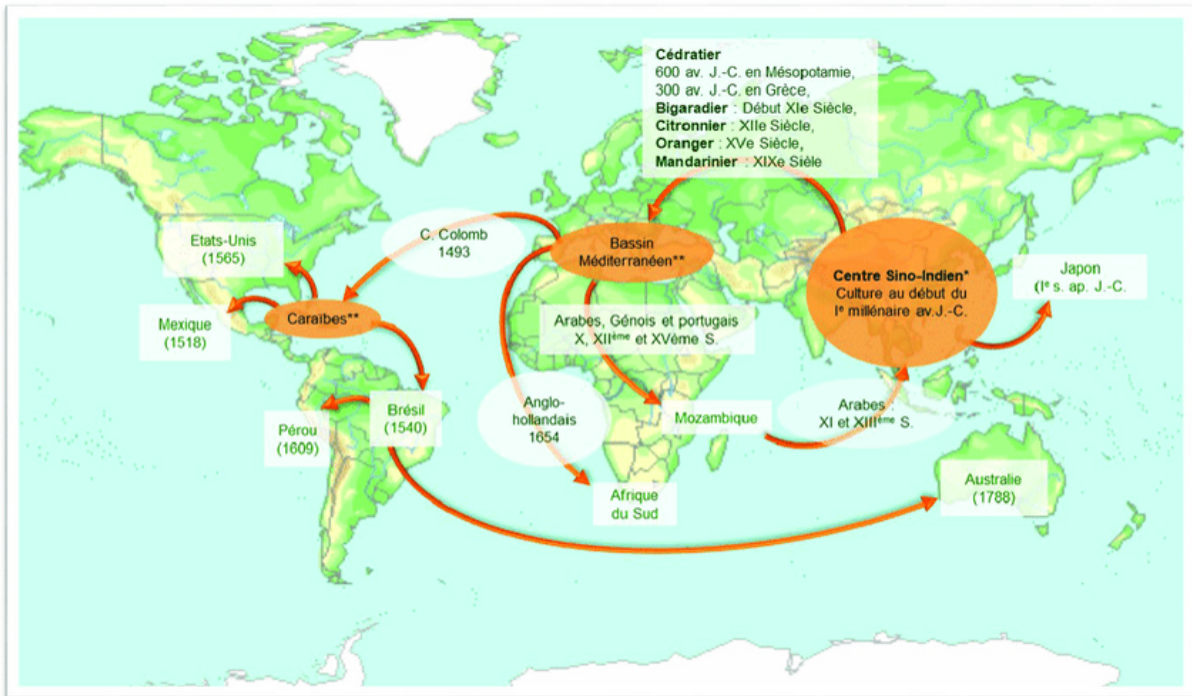


Figure 1 - Carte de l'expansion des agrumes dans le monde (Curk, Luro, & Ollitrault, 2019)

### 1.1.2. Taxonomie des agrumes

La classification des agrumes est riche et a été très discutée à la fin des années 60. Tanaka, (1961), identifie 156 espèces tandis que Swingle et Reece, (1967) en identifient seulement 16. Les agrumes ont la particularité d'être compatibles entre espèces et genres. Ceci explique la très grande complexité d'établir une classification. Les agrumes font partie de la famille des *Rutaceae* (Luro et al., 2018) qui comporte 1600 espèces et 160 genres séparés en 7 sous familles. Les agrumes appartiennent à la sous famille des *Aurantioideae* et c'est elle qui entraîne un certain débat. En effet, Swingle et Reece, (1967) s'accordent pour bien intégrer les agrumes à cette sous-famille. Cette sous famille est elle-même composée de deux tribus les *Clauseneae*, qui serait une sous-tribu plus primitive que la 2<sup>ème</sup> sous tribu, les *Citreae*. Les agrumes appartiennent à la tribu des *Citreae* qui comprend trois sous tribus dont celle des *Citrineae*. Cette sous tribu est elle-même composée de trois groupes dont celui qui nous intéresse les « agrumes vrais ». Ce dernier groupe est représenté par 6 genres botaniques : *Citrus*, *Clymenia*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus*, *Microcitrus*. Néanmoins, les récents travaux de Wu et al., (2018) remettent en question les réflexions taxonomiques et phylogénétiques indiquant une possible reformulation du genre *Citrus*. Dans cette étude, après analyse des séquences et de la phylogénie du génome entier du genre *Poncirus*, il semblerait qu'il soit un genre distinct de celui du genre *Citrus*. De plus, les genres *Fortunella*, *Eremocitrus*

et *Microcitrus* seraient considérés comme des espèces du genre *Citrus* et non comme des genres apparentés.

Parmi le genre *Citrus* est retrouvé 4 grands taxons ancestraux : *Citrus micrantha*, *Citrus medica*, *Citrus reticulata* et *Citrus maxima* donnant ainsi la plupart des espèces d'agrumes cultivés. Le genre *Citrus* représente également le genre le plus diversifié (oranges, citrons, cédrats, mandarines, limes, pomelos, bigarades, etc...) (**figure 2**).

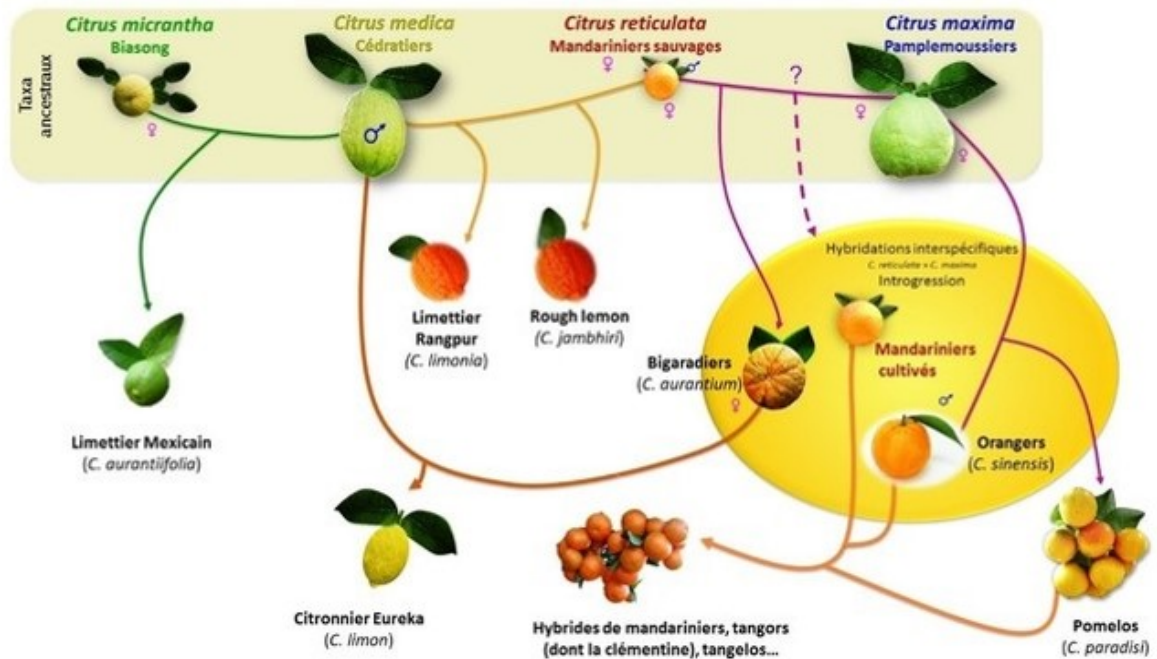


Figure 2 - Origines phylogénétiques des agrumes cultivés (F. Curk, P. Ollitrault, CIRAD)

### 1.1.3. Les porte-greffes

Dans l'agrumiculture, et de façon plus générale dans l'agriculture, l'utilisation de porte-greffes est essentielle. Un porte-greffe est défini comme un végétal sur lequel un greffon (variété d'intérêt) y sera implanté. Les porte-greffes peuvent être multipliés par culture *in vitro*, par bouturage ou encore par semis. Cependant, du fait de leur polyembryonie, certaines variétés de porte-greffes peuvent être multipliées à l'identique par semis, avec des pourcentages de conformité génétique différents (Camille Jacquemond et al., 2013)

Depuis plus d'un siècle, les agrumes ne sont plus cultivés de franc de pied. En effet, ils sont cultivés greffés avec des porte-greffes qui vont leur conférer des propriétés amenant à certaines caractéristiques de tolérances face à l'environnement (Allario et al., 2011; Khalid et al., 2020; Oustric et al., 2017; Ruiz et al., 2020) ou encore à des maladies telles que la tristeza

(Jacquemond et al., 2013). Cette association a connu un large succès et aujourd'hui la grande majorité des agrumes sont cultivés de manière bi-composite dans les systèmes de production : une variété possédant des qualités relatives à la partie aérienne (appelée « greffon ») est greffée sur une autre variété reconnue pour ses qualités racinaires (le « porte-greffe »). Chez les agrumes, les caractères juvéniles lorsque l'arbre est planté par semis persistent plusieurs années : branches épineuses, arbre très vigoureux avec un port dressé et au final entrée en production tardive (Cameron & Frost, 1968). Plusieurs espèces et variétés d'agrumes n'ont qu'une faible résistance au froid ou à certaines maladies du sol, pas ou peu de tolérance à la salinité ou au déficit hydrique qui constituent pourtant des qualités intrinsèques souhaitables pour leur survie (Bitters, 1986).

L'idée d'associer des variétés d'agrumes possédant ces qualités d'adaptation avec d'autres variétés plus sensibles mais de bonne qualité fruitière est née au XII<sup>ème</sup> siècle en Espagne. A l'époque, l'objectif était essentiellement de se prémunir contre les attaques de *Phytophthora* spp. (*Phytophthora citrophthora* et *Phytophthora parasitica*) une maladie de dégénérescence causée par un champignon du sol (Duportal et al., 2013). Le greffage permet ainsi de réunir deux plantes génétiquement différentes en une, en valorisant leurs caractères respectifs. De plus, les caractères juvéniles induits par le semis sont inhibés lors de la multiplication par greffage. La principale contrainte est alors la notion de compatibilité entre le greffon et le porte-greffe. Les cultivars d'agrumes sont multipliés par voie végétative par greffage pour maintenir l'intégrité du cultivar souhaité tandis que les porte-greffes sont multipliés par graines (polyembryonnées) et sont sélectionnés pour leurs résistances aux maladies et aux nématodes. Plusieurs recherches ont aujourd'hui démontré les multiples avantages procurés par cette pratique. Les caractéristiques pouvant être induites par l'association porte-greffe/greffon sont notamment :

- La tolérance de certaines associations à des maladies (Citrus Tristeza Virus, Citrus exocortis viroid),
- La résistance aux bioagresseurs du sol (phytophthora, nématodes),
- L'adaptation à la physique et chimie du sol (tolérance à la salinité, à la sécheresse, au calcaire, à l'hydromorphie) (Allario et al., 2013; Khalid et al., 2020; Oustric et al., 2017),
- L'influence sur la vigueur et la productivité, avec une rapidité de mise à fruits de la partie greffée (Jayswal & Lal, 2020),

Cette utilisation de porte-greffes a montré l'impact de ces derniers dans différents travaux sur la pastèque (Yan et al., 2018), les poivrons (Penella et al., 2015) vis-à-vis du stress salin.



D'autres travaux chez les agrumes (Allario et al., 2013) et le tabac (Liu et al., 2014) ont montré l'efficacité de certains porte-greffes face à la sécheresse et donc au déficit hydrique.

Un nombre restreint de porte-greffes est actuellement utilisé à travers le monde possédant chacun des qualités propres (*Citrus volkameriana*, Bigaradier, Limettier Rangpur, Citrange carrizo, Citrumelo swingle, *Poncirus trifoliata*, Mandarinier Cléopâtre...) (Stover & Castle, 2002). Aujourd'hui, du fait de sa tolérance au virus de la tristeza (CTV) et des températures froides, le porte-greffe Citrumelo Swingle 4475 (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trioliata* (M.) Raf.) est un des porte-greffes les plus utilisés dans le monde (Amérique centrale, Afrique du Sud, Australie, etc.).

#### **1.1.4. Contexte économique**

En 2016, c'est plus de 124 millions de tonnes (Mt) d'agrumes qui sont produits dans le monde (FAO, 2017). Malgré des baisses de production au fil des années, la production mondiale d'agrumes de 2019 à 2020, toutes espèces confondues, s'élève à plus de 110Mt/an en Europe, sur une superficie de 7,5 millions d'hectares environ. Les oranges dominent le marché du fruit frais en représentant environ 60% de la production totale d'agrumes. Il est escompté que la production d'oranges devrait augmenter de 3,6 Mt pour la période 2020/2021. Les tangerines, mandarines, clémentines et satsumas comptent pour 23% du volume mondial. Environ 13,7 Mt de citrons et de limes, ainsi que 4,4 Mt de pamplemousses et pomelos sont produits annuellement. Néanmoins, la production globale des limes devrait, elle, baisser et atteindre les 8,3 Mt en 2021 (USDA, 2021). Toutefois, depuis plusieurs années, l'agrumiculture est en danger en raison de différentes contraintes abiotiques (sécheresse, salinité des sols, etc.) ou encore biotiques (maladies, ravageurs).

A ce jour, l'une des plus grandes contraintes pour l'agrumiculture reste la maladie du Huanglongbing (HLB, encore appelée Citrus greening) qui, depuis une quinzaine d'années, ne cesse de progresser dans le monde.

Le HLB a entraîné au fil des années un impact économique important. Cette bactériose est l'une des maladies les plus destructrices des agrumes. Dès qu'il est établi, lutter contre le HLB pour maintenir une production continue d'agrumes s'avère difficile et coûteux (Li et al., 2020). Les pertes dues à la maladie peuvent être très importantes (Gottwald, 2010) comme c'est le cas en Floride où la chute de production est estimée à près de 80% (Albrigo & Stover, 2015). Dans certains cas, des parcelles entièrement infectées ont conduit à des pertes totales de

récoltes. Une étude faite en 2016 indique que la plupart des comtés de Floride présentaient une perte de 90 à 100% de production due au HLB (Neupane & Moss, 2016). Les pertes économiques signalées en Inde, aux Philippines sont la traduction de l'infection par le HLB de plus de sept millions d'arbres. En Thaïlande et Taïwan, ce sont près de trois millions d'arbres qui ont été infectés par la bactérie responsable de la maladie. En Indonésie, les plantations ont été abandonnées ou ont disparu dans leur totalité (FAO, 2003). Une relation significative a pu être mise en évidence entre la sévérité du HLB et la perte d'agrumes au Brésil (Bassanezi et al., 2011).

Avant les années 2010, les productions d'agrumes dans la Caraïbe étaient en augmentation. Avec l'apparition de la maladie dans la Caraïbe, il y a une chute constante de la production d'agrumes dans la région (**figure 3**). La diminution de la production des agrumes dans le bassin caribéen s'avoisine autour de 24% entre 2008 et 2016 (FAO, 2017). En 2019, la chute de production des agrumes continue avoisinant les 589,6 Mt dans le bassin caribéen (FAO, 2021).

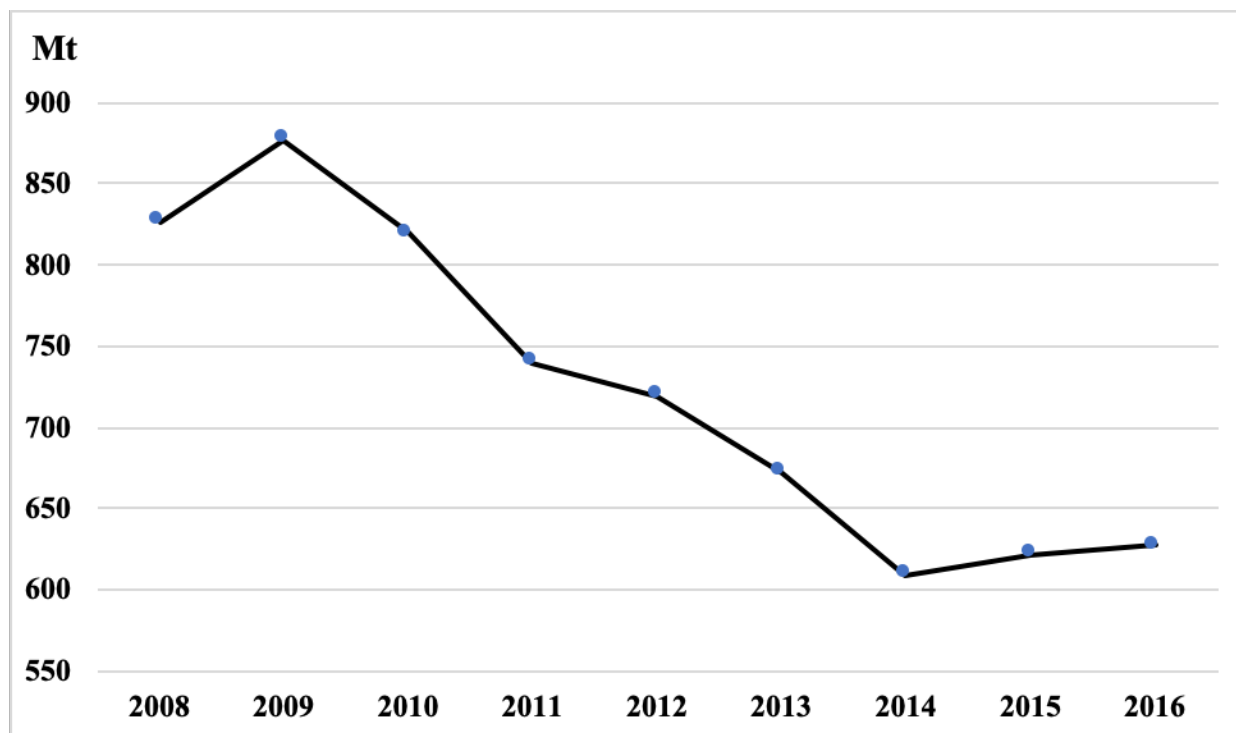


Figure 3 - Évolution de la production (en milliers de tonnes) d'agrumes cultivés dans le bassin caribéen entre 2008 et 2016 (FAO, 2017)

En Guadeloupe, après la détection du HLB en 2012, les productions d'agrumes cultivés tels que les pamplemousses, les limes, les mandarines ou encore les oranges ont considérablement chutés.

En lien avec ces pertes économiques importantes, de nombreuses études ont été réalisées pour évaluer la résistance ou la tolérance des apparentés agrumes vis-à-vis de maladies et plus particulièrement du HLB. Les études ont souvent du mal à être concordantes sur les espèces identifiées comme résistantes ou tolérantes. Ramadugu et al., (2016) distingue deux variétés immunisées, six variétés résistantes et quatorze variétés tolérantes. Selon cette étude, ces tolérances et résistances sont la conséquence de facteurs multiples : la capacité de colonisation des psylles (insectes vecteurs de la maladie), l'absence de multiplication de la bactérie responsable de la maladie, la réplication transitoire de la bactérie, l'infection retardée ou une meilleure défense de la plante à la suite de l'infection. Enfin, la diversité des agrumes montre que selon les variétés, une tolérance plus ou moins accrue est observable. Des variétés d'agrumes comme Tangelo Jackson, mandarinier Fallglo ou encore Tangor Temple présentent une meilleure tolérance par rapport aux différentes variétés d'orangers, considérées comme variétés sensibles (Stover et al., 2015).

En plus de la diversité chez les agrumes, la polyploïdie semble être une voie prometteuse dans la tolérance aux maladies et donc au HLB.

## **1.1. Polyplöidie**

### **1.1.1. Généralités**

La ploïdie se définit comme une duplication du génome entier d'un organisme ou encore d'une cellule (Fox et al., 2020). Ainsi, la spécificité d'un individu polyploïde est qu'il possède un nombre de chromosomes supérieur à  $2x$  copies. La polyploïdie aura alors un effet sur l'ensemble du génome, des cellules, etc. conférant ainsi, des avantages et aussi des inconvénients (Comai, 2005; Fox et al., 2020; Ruiz et al., 2020).

Bien qu'elle soit commune chez les plantes et rare dans le règne animal, la polyploïdie est retrouvée de manière fréquente chez les poissons ou encore chez les amphibiens (Christoffels et al., 2004; Mable et al., 2011; Otto & Whitton, 2000). La polyploïdisation est un des principaux facteurs dans l'évolution des plantes et joue un rôle majeur chez celles-ci. Il est estimé que 50 à 70% des angiospermes, plantes à fleurs qui portent des fruits, sont concernés (Masterson, 1994). Chez les angiospermes, ce phénomène est un phénomène naturel et est

responsable de l'ordre de 2 à 4% dans la création de nouvelles espèces (Otto & Whitton, 2000).

En fonction de leur génome, il peut y avoir une variation de la ploïdie et les polyploïdes peuvent être classés en deux catégories bien distinctes (**figure 4**) :

- Les autopolyploïdes,
- Les allopolyploïdes.

L'autopolyploïde est un individu qui a un nombre anormal de chromosomes ayant pour origine un doublement de chromosomes au sein d'une même espèce ou une fusion de gamètes non-réduits ( $2n$ ). A contrario, un allopolyploïde est un individu qui a un doublement chromosomique résultant d'une hybridation entre deux espèces ou genres différents. De ce fait, les allopolyploïdes possèdent deux génomes différents contrairement aux autopolyploïdes qui possèdent un seul et unique génome.

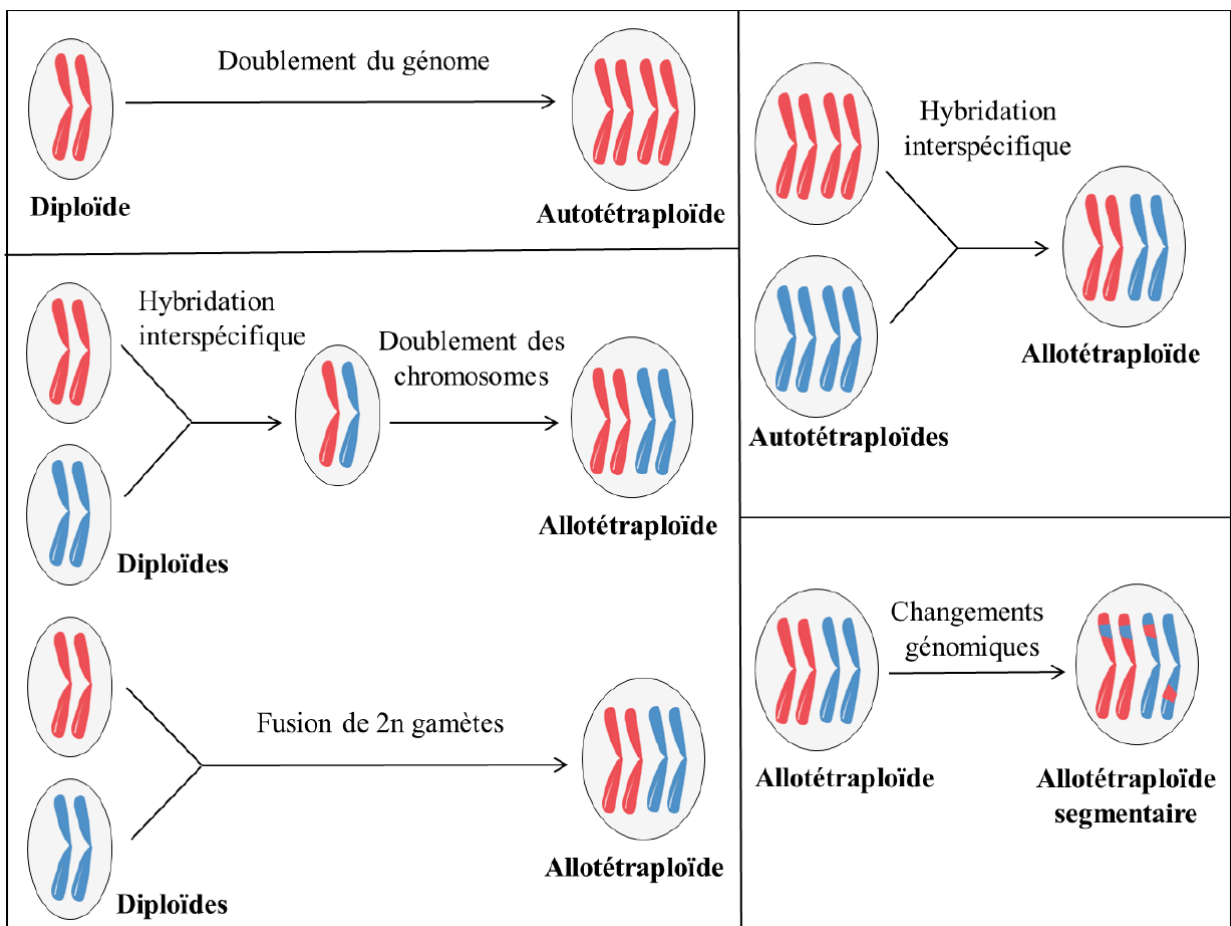


Figure 4 - Les différents types de polyploïdes (Thèse Julie Oustirc d'après Chen, 2007)

La polyploïdie va conférer certains avantages comme l'hétérosis qui permettra aux

individus d'être plus vigoureux que leurs progénitures diploïdes. La redondance des gènes va permettre, quant à elle, de protéger les individus polyplœides des effets délétères des mutations. Enfin, la polyplœidie va jouer un rôle dans la sexualité permettant ainsi une auto-fertilisation chez certaines espèces (Comai, 2005).

Deux mécanismes vont engendrer la polyplœidie. Ces mécanismes sont la polyplœidisation somatique qui est un doublement somatique du génome et la polyplœidisation sexuelle qui la formation de gamètes non-réduits.

Malgré sa rareté, la polyplœidisation somatique résulte de l'absence de mitose. L'ADN est alors répliqué sans division cellulaire. Cette polyplœidisation peut être induite également en laboratoire à partir d'agents physiques (choc thermiques) ou encore chimiques (colchicine ou colcémide) afin de produire des plants d'intérêt (Tayalé & Parisod, 2013).

Chez la plupart des plantes, la polyplœidisation sexuelle reste beaucoup plus fréquente que celle somatique. Elle résulte d'anomalies méiotiques – induites par des facteurs génétiques ou environnementaux (Bretagnolle & Thompson, 1995; Ramsey & Schemske, 1998) – qui interviennent lors de la première (FDR : First Division Restitution) ou seconde division (SDR : Second Division Restitution) de méiose (De Storme & Geelen, 2013) (**figure 5**). La FDR est caractérisée par l'absence de la 1<sup>ère</sup> division de méiose. Elle entraîne alors la formation de deux gamètes diploïdes contenant deux chromatides non-sœurs. Ainsi, au sens strict, la FDR conserve pleinement l'hétérozygotie et l'épistasie parentale. Dans certains types de FDR, l'hétérozygotie parentale n'est pas retenue par l'omission de la 1<sup>ère</sup> division de méiose mais par d'autres altérations cytologiques. Dans ce cas, l'hétérozygotie parentale n'est que partiellement conservée (Ramanna & Jacobsen, 2003). Le mécanisme de type SDR est observé lors de la 2<sup>ème</sup> division de méiose. En effet, il y a omission de celle-ci. Il y a alors formation de deux gamètes diploïdes contenant deux chromatides sœurs. Dans le cas de la SDR, la 1<sup>ère</sup> division méiotique se déroule normalement, avec appariement et recombinaison corrects, les gamètes générés sont toujours homozygotes du centromère au premier crossing-over. L'hétérozygotie parentale est conservée du côté télomérique (Ramanna & Jacobsen, 2003).

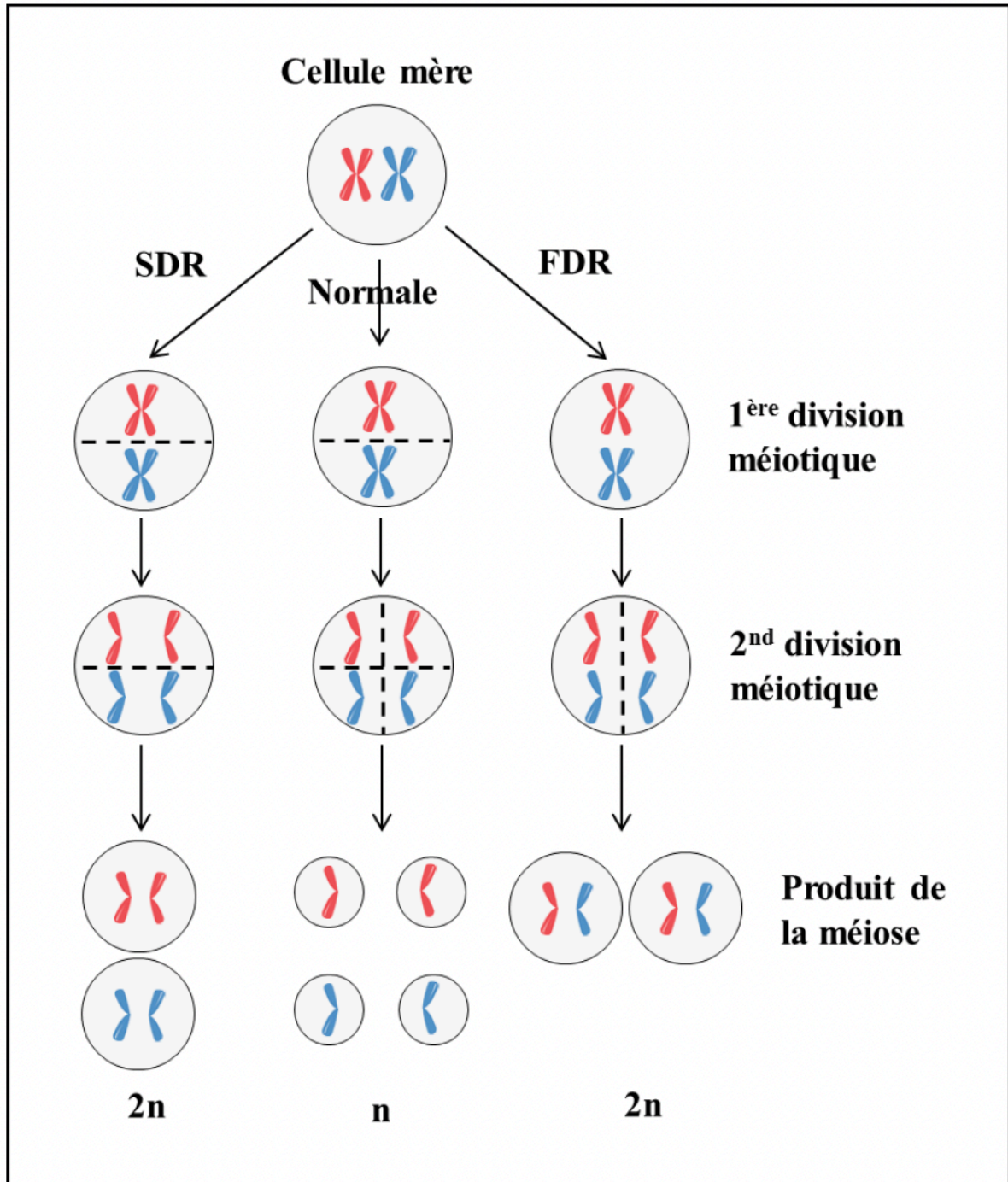


Figure 5 - Conséquences de la FDR et SDR lors de la méiose (Thèse Julie Oustric d'après Bretagnolle & Thompson, 1995)

### 1.1.2. Impact de la polyploïdie chez les agrumes

La ploïdie qui domine chez les agrumes est la diploïdie. En effet, les agrumes sont généralement diploïdes et possèdent 18 chromosomes ( $n=9$ ) (Ollitrault et Jacquemond, 2003). Néanmoins, il existe des agrumes polyploïdes naturels, les plus communs étant triploïdes ou tétraploïdes.



Les fruits des plants polyploïdes sont moins juteux, ont une écorce plus épaisse et présentent moins de pépins mais restent de plus grande taille. Après duplication, les deux copies de gènes peuvent se spécialiser afin de donner des fonctions complémentaires et donc de s'exprimer à des moments différents ou dans des tissus spécifiques (Allario et al., 2011). De plus la polyploïdie a, pour principale conséquence, d'augmenter la taille des cellules (**figure 6**) (Comai, 2005; Ruiz et al., 2020; Stebbins, 1971) et à plus grande échelle la taille des organes (Beest et al., 2012). Les plants polyploïdes sont alors plus souvent « trapus » et robustes. Il montre également une certaine augmentation de la taille de certains organes comme les fruits, les feuilles, les racines ainsi que les graines.

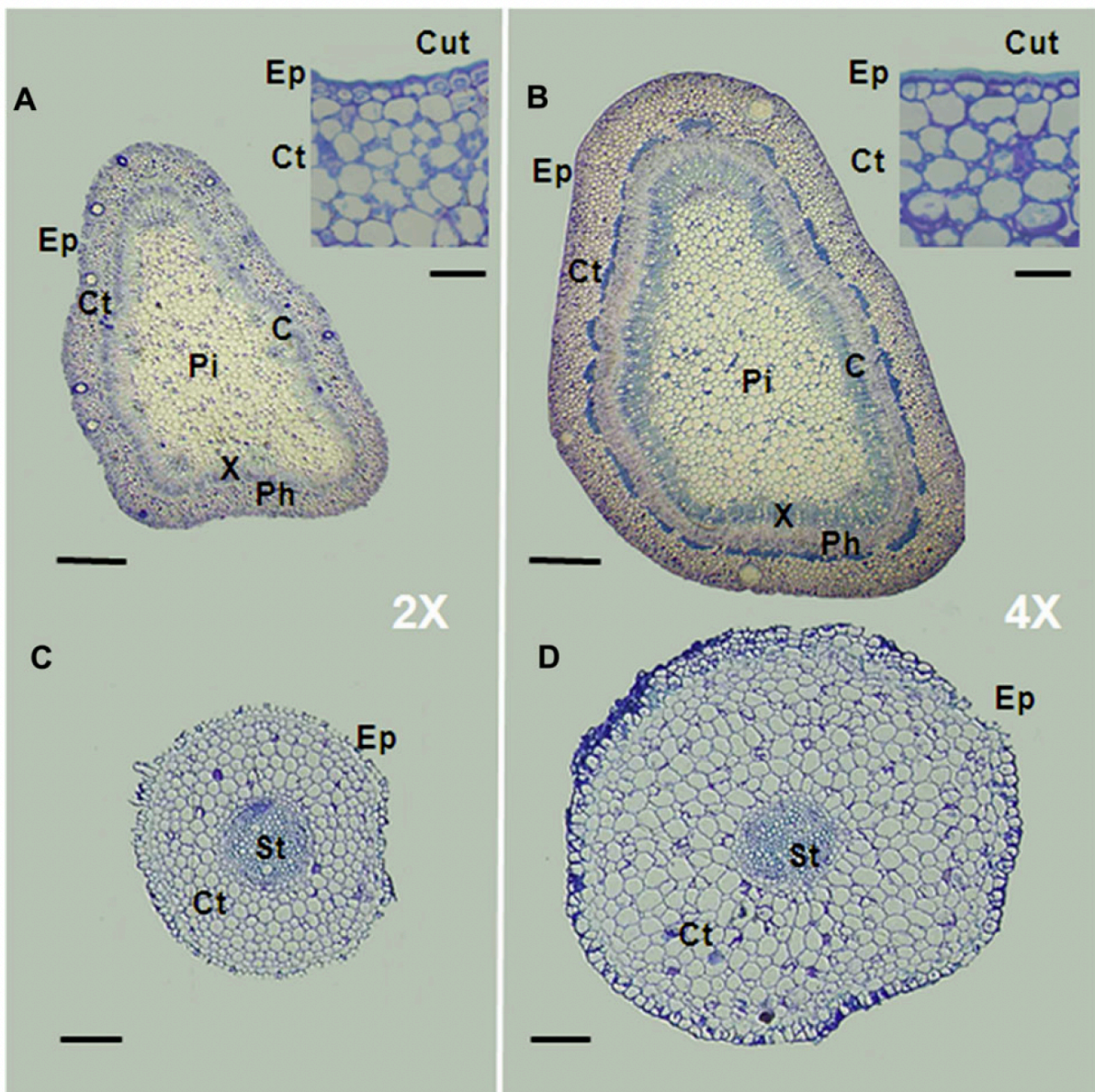


Figure 6 - Microscopie de tige 2x (A), 4x (B) et de racines 2x (C) et 4x (D) (Allario et al., 2011)

Néanmoins, les plants 4x présentent généralement un retard de croissance, ils sont donc plus petits que les plants 2x. Ce retard de croissance peut être expliqué par le fait que les cellules polyploïdes auraient besoin de plus de temps pour se développer (Corneillie et al., 2019). De plus, l'étude de Corneillie et al., (2019) a montré que la polyploïde n'aurait pas un impact sur la totalité de la plante et que le nombre total de cellules épidermiques et stomatiques diminueraient au fur et à mesure que le niveau de ploïdie augmenterait. Ce qui pouvait être retrouvé avec le nombre moins important des stomates et des chloroplastes mais avec une taille beaucoup plus importante chez les 3x tandis que le nombre de stomates et chloroplastes était plus important chez les 2x mais cette fois-ci avec une taille moindre (Lourkisti et al., 2021).

Les polyploïdes d'agrumes présentent une meilleure adaptation à leur environnement (pour revue, voir Ruiz et al., 2020) et donc une meilleure tolérance aux stress abiotiques tels que le stress salin (Khalid et al., 2020; Saleh et al., 2008), des températures froides (Oustric et al., 2017) ou encore le déficit hydrique (Vieira et al., 2016). L'étude d'Allario et de ses collaborateurs (**figure 7**) a démontré qu'en greffant une variété d'orange sur des porte-greffes limettier Rangpur diploïdes (2x) et tétraploïdes (4x), les variétés greffées avec les porte-greffes 4x se comportaient nettement mieux que celles greffées avec des porte-greffes 2x, après un déficit hydrique de 11 jours (Allario et al., 2013). L'étude récente de Lourkisti et al., (2021) a également montré que les variétés 3x possédaient une plus grande tolérance face au déficit hydrique par rapport à des 2x, grâce à des caractéristiques anatomiques et cytologiques apportées par la polyploïdie.



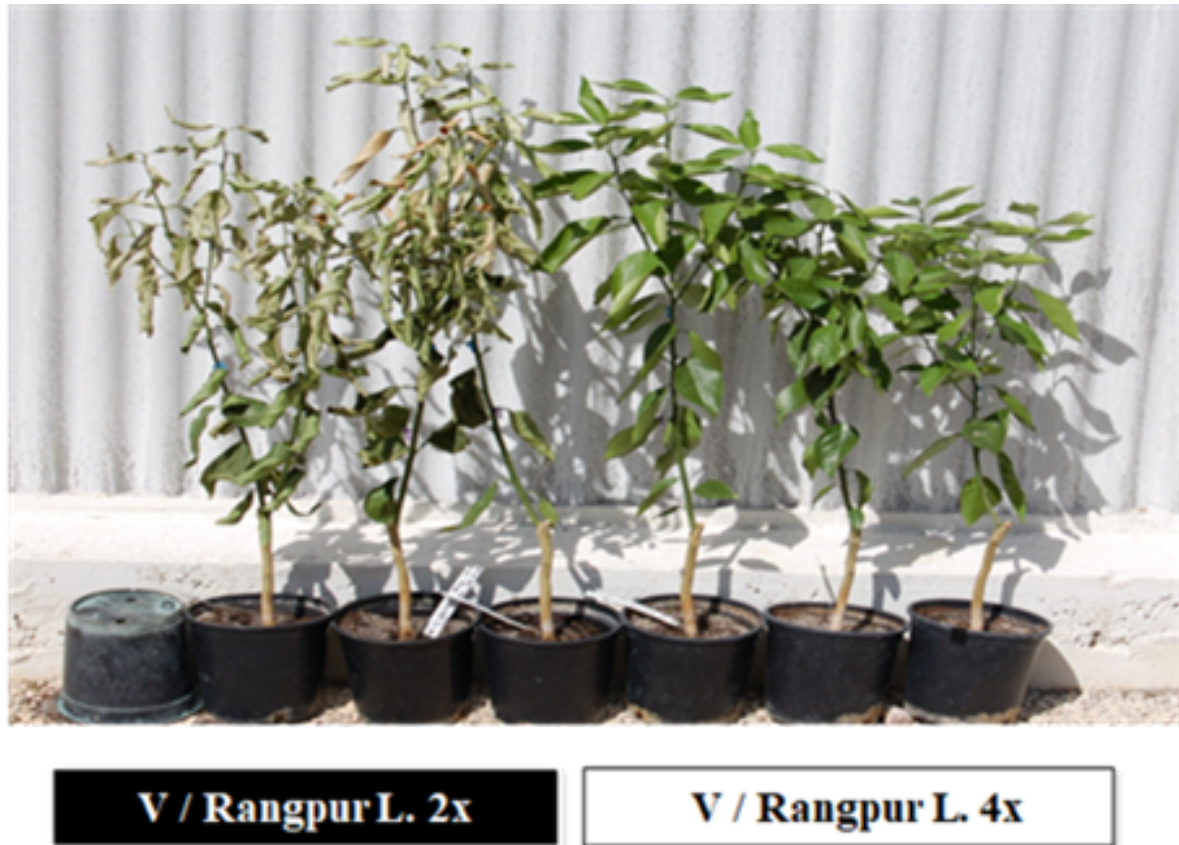


Figure 7 - Comportement d'une variété d'orange greffées avec un porte-greffes (limettier Rangpur) 2x et 4x après un déficit hydrique de 11 jours (Allario et al., 2013).

La polyploïdie modifierait ainsi l'expression des gènes dans les racines pour réguler la voie de signalisation de l'acide abscissique (ABA) et améliorerait ainsi l'adaptation de la variété greffée suite à un stress (Allario et al., 2013). De plus, l'étude de Oustric et al., (2019) a montré que les génotypes d'agrumes 4x montraient une plus grande tolérance face à une carence prolongée en éléments nutritifs par rapport à leurs 2x respectifs dans des conditions de stress. En plus des stress comme le déficit hydrique ou le stress salin, certains porte-greffes sont résistants ou tolérants à certaines maladies (Jacquemonod et al., 2013).

## **1.2. Mécanisme de défense de la plante**

### **1.2.1. Le stress oxydant**

Induit suite à différents stress biotiques ou abiotiques, le stress oxydant se définit alors comme un déséquilibre entre la production des ROS et l'élimination de celles-ci (Migdal & Serres, 2011) par le système antioxydant entraînant ainsi des dommages cellulaires.

### 1.2.1.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle clé dans le mécanisme de défense des plantes (Huang et al., 2019), exercent une action antimicrobienne directe (Dmytriiev & Kravchuk, 2005). Ce sont des petites molécules qui sont synthétisées dans différents compartiments cellulaires de la plante comme les chloroplastes, les mitochondries, les membranes plasmiques ou encore les réticulums endoplasmiques (Choudhary et al., 2020; Krishnamurthy & Rathinasabapathi, 2013). Dans des conditions normales de culture, les ROS sont continuellement produites de manière équilibrée et vont jouer un rôle dans différents processus physiologiques tels que le développement de l'arbre, le cycle cellulaire ou encore la mort programmée (**figure 8**) (Gill & Tuteja, 2010; Krishnamurthy & Rathinasabapathi, 2013). Cependant, certains stress peuvent modifier l'équilibre entre la production et l'élimination de ROS. Cette surproduction de ces molécules, qui sont hautement réactives, va entraîner d'importantes lésions cellulaires ainsi que l'inhibition de la photosynthèse (Choudhury et al., 2017). Une des conséquences des ROS est qu'elles peuvent nuire à la production de biomolécules comme une dégradation des acides nucléiques, protéines ou encore une peroxydation des lipides (Das & Roychoudhury, 2014; Gill & Tuteja, 2010) entraînant ainsi la mort cellulaire (Choudhary et al., 2020).

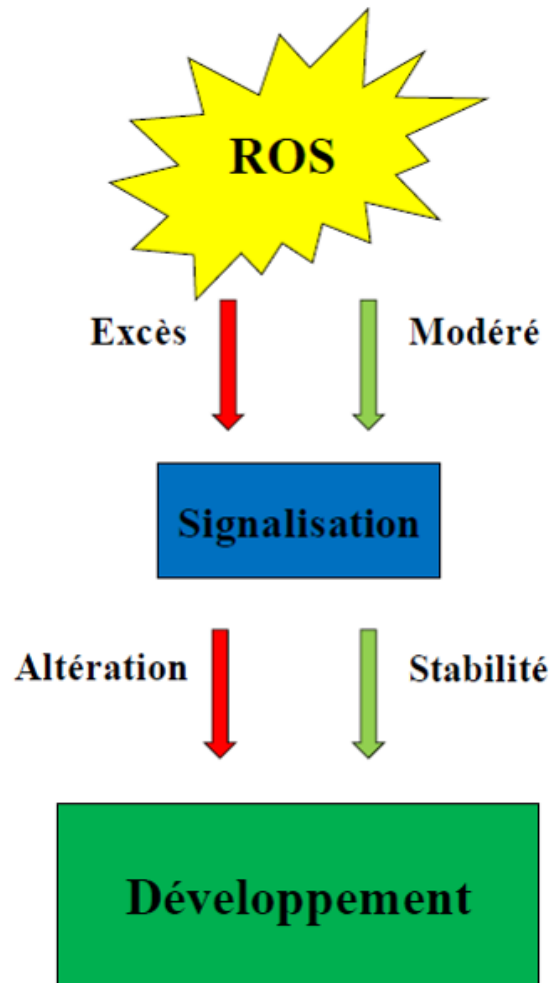


Figure 8 - Effet des ROS sur l'arbre d'après Krishnamurthy & Rathinasabapathi, (2013). Flèches rouges : effets négatifs ; flèches vertes : effets positifs

Les ROS peuvent être de nature radicalaire comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) ou de nature non radicalaire comme l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

- Contrairement aux autres ROS, l'oxygène singulet ne provient pas d'électrons mais d'un transfert d'énergie d'excitation. Il est produit dans les chloroplastes à cause de différents stress (Wituszyńska & Karpiński, 2013). Sous haute lumière, il peut être produit à partir d'un état triplet de la chlorophylle au niveau du photosystème II de la phase photochimique de la photosynthèse (Tripathy & Oelmüller, 2012). Il peut également être produit dans le système antennaire lorsqu'il y a une dissipation insuffisante de l'énergie au cours de la photosynthèse ou encore dans le centre réactionnel par recombinaisons d'une paire de radicaux (Pospíšil & Prasad, 2014).
- Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) résulte soit d'une réduction bi-électronique de l' $O_2$ ,

soit d'une réduction mono-électronique de l'anion superoxyde. Selon sa concentration, le rôle de  $H_2O_2$  varie. En effet, à faible concentration intracellulaire, il est impliqué dans la signalisation permettant la réponse aux stress biotiques et abiotiques mais aussi dans le renforcement des parois cellulaires, la photosynthèse ou encore le mouvement stomatique. En revanche, à forte concentration, il endommage les cellules jusqu'à entrainer leur mort (Nazir et al., 2019). Cet intermédiaire, bien qu'il ne soit pas radicalaire est relativement toxique et de plus possède une durée de vie assez longue, de l'ordre des minutes. Il peut également diffuser loin de son site de production et peut même traverser les membranes (Parent et al., 2008).

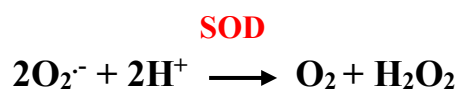
- L'anion superoxyde ou encore le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) est généralement la première des ROS à être produite dans les cellules. Il est formé par la capture d'un électron par une molécule d' $O_2$ . La toxicité de ce radical peut être directe envers les substrats bio-organiques mais également indirecte car elle peut interagir avec l' $H_2O_2$  et donner naissance à des  $\cdot OH$ . Il peut être produit aussi dans les mitochondries (Choudhary et al., 2020) et tout comme l' $H_2O_2$ , il a la capacité de diffuser loin de son site de production (Parent et al., 2008).
- Le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) est l'espèce radicalaire la plus délétère. En effet, bien que sa durée soit très courte, il peut réagir avec quasiment toutes les molécules biologiques et est assez toxiques vis-à-vis de tous constituants cellulaires comme l'ADN, les protéines ou encore les lipides. Cette espèce réactive de l'oxygène peut être formée à partir du  $H_2O_2$  interagissant avec des ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ) *via* la réaction de Fenton ou avec l' $O_2^{\cdot-}$  *via* la réaction d'Haber-Weiss (Inagaki et al., 2016; Parent et al., 2008).

Pour gérer le déséquilibre lié au stress oxydatif, les plantes sont capables d'induire une succession de réaction de détoxification.

### **1.2.1.2. Mécanisme de défense antioxydant**

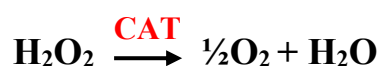
Le système oxydant comprend des mécanismes du stress oxydant qui sont regroupés en deux grands groupes : le système oxydant enzymatique et le système oxydant non enzymatique.

- Dans le système oxydant enzymatique on va retrouver la superoxydase dismutase (SOD) qui est une métalloprotéine présente dans tous les organismes aérobies. Elle constitue la première ligne de défense contre le stress oxydant et son rôle sera de catalyser la dismutation de 2  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  et  $O_2$  dans la majorité des compartiments où ils sont produits (Bowler et al., 1992).



Trois isoformes de SOD existent et se distinguent par le métal présent au niveau de leur groupement prosthétique. Le 1<sup>er</sup> type est le Cu/Zn-SOD et on le retrouve de façon abondante dans le cytosol, le chloroplaste et le peroxysome. Le Fe-SOD se trouve principalement dans les chloroplastes alors que le Mn-SOD se retrouve dans les mitochondries et les peroxysomes (Wang et al., 2016). Des études ont montré que chaque isoforme joue un rôle unique ou synergique dans la survie des plantes dans des environnements stressants (Gill & Tuteja, 2010)

- La catalase est une molécule qui va catalyser comme réactifs les deux produits formés par la SOD en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Elle joue un rôle majeur dans le métabolisme et la protection des plantes. Elle permet de réguler l'excès d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit au cours d'un stress (Mittler, 2002).



La catalase (CAT) est retrouvée dans les peroxysomes dans quasiment tous les organismes exceptés quelques uns et de par sa faible affinité avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, son rôle est de dégrader celui-ci lorsqu'il est produit en excès (Mhamdi, Noctor, & Baker, 2012). Contrairement à l'ascorbate peroxydase, elle ne nécessite pas de molécules réductrices et peut agir seule sur l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une seule molécule de CAT permet de dégrader environ 6 millions de molécules d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minutes. Chez les plantes, le nombre d'isoformes de la catalase est variable (Aebi, 1984; Gill & Tuteja, 2010).

- Peroxydase la plus importante, l'ascorbate peroxydase (APX) réduit également l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O en utilisant le pouvoir de l'acide ascorbique comme donneur d'électron (Jebara et al., 2005; Mittler, 2002). Contrairement à la CAT, elle possède une plus forte affinité pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lui conférant ainsi un rôle majeur dans la dégradation de celui-ci (Wang et al., 1999).



D'autres molécules telles que gaïacol peroxydase (GPX), le monodehydroascorbate réductase (MDHAR) ou encore le dehydroascorbate réductase (DHAR) ont été décrites dans la littérature dans leur rôle dans l'élimination des ROS (Das & Roychoudhury, 2014; Uarrota et al., 2016).

Le système non enzymatique comprend le glutathion, la proline et l'ascorbate.

- Le glutathion (GSH) est un tripeptide de faible masse moléculaire et il intervient dans la régulation du développement de la plante et la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Frendo et al., 2013). Il est considéré comme la défense intracellulaire la plus importante contre la protection des dommages oxydatifs induits par les ROS. Il est abondant sous forme réduite dans les tissus végétaux et on le retrouve dans tous les compartiments cellulaires comme le cytosol, les mitochondries, les plastes ou encore le réticulum endoplasmique. Il joue également un rôle important dans plusieurs processus physiologiques comme la régulation du transport de sulfate ou l'expression des gènes répondant au stress (Gill & Tuteja, 2010; Mullineaux & Rausch, 2005).
- La proline (Pro) est un acide aminé qui joue un rôle important chez les végétaux. Outre son rôle dans l'osmorégulation du cytoplasme, elle est considérée maintenant comme un puissant antioxydant non enzymatique chez les microbes, les animaux et les plantes afin de d'atténuer les effets toxiques des ROS. Sa synthèse a lieu principalement dans le cytosol mais aussi dans le chloroplaste lors d'un stress. Elle jouerait également un rôle dans la stabilisation des structures cellulaires et à la protection des fonctions cellulaires en dégradant directement les ROS. L'accumulation accrue de proline a été corrélée à une meilleure tolérance aux stress abiotiques tels que le stress salin ou le déficit hydrique (de Campos et al., 2011).
- L'acide ascorbique (AsA), appelé encore ascorbate ou vitamine C, reste l'antioxydant le plus important chez les végétaux car il permet de prévenir ou minimiser les dommages cellulaires que les ROS auront induits chez les plantes. Il est considéré comme un puissant antioxydant car il a la capacité de donner des électrons dans plusieurs réactions enzymatiques (cf : APX) et non enzymatiques. De plus, il peut protéger les membranes en piégeant directement l' $O_2^{\bullet-}$  et l' $\bullet OH$  en régénérant l' $\alpha$ -tocopherol à partir du radical tocopheroxyl (Gill & Tuteja, 2010).

En plus de tous ces composés qui permettent de réduire considérablement l'excès de production de ROS, des familles de composés comme les polyphénols, une famille de molécules hydrosolubles largement présente dans le règne végétal, sont utiles également à la plante pour ses réactions de défense contre les attaques de l'environnement. Les polyphénols dont les flavonoïdes et les acides phénoliques sont les classes majoritaires, interviennent dans le développement de la plante en améliorant entre autre le métabolisme de celle-ci (Sharma et al., 2019). Les composés polyphénoliques, peuvent réduire le stress. Il a été démontré qu'ils exercent des effets antioxydants par un certain nombre de mécanismes (Agati et al., 2012; Kumar & Pandey, 2013). Leur activité antioxydante est principalement due à leurs propriétés d'oxydoréduction, les capteurs de l'oxygène singulet qui peuvent jouer un rôle dans l'adsorption et la neutralisation des radicaux libres. Suite à un stress, la concentration en composés polyphénoliques augmente afin de pouvoir lutter contre celui-ci (Sharma et al., 2019). Il est possible de doser les polyphénols. Le principe de la mesure des composés phénoliques repose sur le transfert d'électrons en milieu alcalin à partir de composés polyphénoliques pour former un chromophore bleu constitué d'un complexe phosphotungstique / phosphomolybdène où l'absorption maximale dépend de la concentration en composés polyphénoliques (Everette et al., 2010). Le réactif réduit de Folin-Ciocalteu est détectable avec un spectrophotomètre dans la plage de 690 à 710 nm.

### **1.2.2. Réaction d'hypersensibilité (HR) et réaction systémique acquise (SAR)**

Suite à différentes attaques de pathogènes, les plantes sont capables de réagir suite à l'activation de mécanismes de défenses naturels. En effet, des récepteurs PPRs (Pattern-Recognition Receptors) sont capables de reconnaître spécifiquement certaines molécules spécifiques des micro-organismes appelées PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) situés sur la membrane des pathogènes (Asai et al., 2002; Freeman & Beattie, 2008). Les PAMPs sont des lipopolysaccharides, peptidoglycanes, flagelline bactérienne ou encore des mannanes de levure. La reconnaissance de ces molécules entraîne la mise en place du PTI (PAMP-Triggered Immunity) qui est la première phase de défense active contre les pathogènes et qui prévient l'infection. Néanmoins, il a été montré que dire que ces PTI étaient associés spécifiquement à des agents pathogènes était quelque peu erroné car des agents non-pathogènes étaient capables de synthétiser ces molécules (Ausubel, 2005). Pour établir l'infection, les pathogènes ont mis en place une forme de résistance en injectant des effecteurs (E) dans les cellules des plantes. La plante se défend en synthétisant des protéines de résistance (R) afin de

contrer cette stratégie de virulence des pathogènes. La reconnaissance d'un effecteur E et d'une protéine R entraîne la mise en place de l'ETI (Effector-Triggered Immunity) contre le pathogène. Les protéines R jouent alors deux rôles (**figure 9**).

Lors d'une attaque de pathogène, le PTI puis l'ETI se mettent en place impliquant les protéines R. Ces protéines vont stimuler la production de ROS (*cf. 1.2.1.1. Les espèces réactives de l'oxygène*) pour renforcer les parois cellulaires et former une barrière autour de l'agent pathogène afin d'empêcher sa propagation : c'est la réaction d'hypersensibilité (HR). Cette réaction d'hypersensibilité à l'aide des mécanismes de détoxication mènera à la mort cellulaire programmée (Freeman & Beattie, 2008; Gilchrist, 1998; Heath, 2000).

Le second rôle des protéines R sera de stimuler l'accumulation d'une hormone de défense appelée acide salicylique (SA). Cette hormone sera responsable de l'induction des mécanismes de résistance systémique acquise (SAR) (Durrant & Dong, 2004). La synthèse de SA se fait par deux voies incluant la catalyse de deux molécules, la chorismate et la phénylalanine qui font intervenir respectivement l'ischorismate synthase (ICS) et la phénylalanine synthase (PAL). Le gène *PAD4* participe à l'accumulation de SA (Fu & Dong, 2013; Liu et al., 2016). L'étude de Alvarez et al., (1998) a montré que les ROS pouvaient activer les défenses de la plante par le biais de la SAR dans toute la plante à faible niveau (Durrant & Dong, 2004).



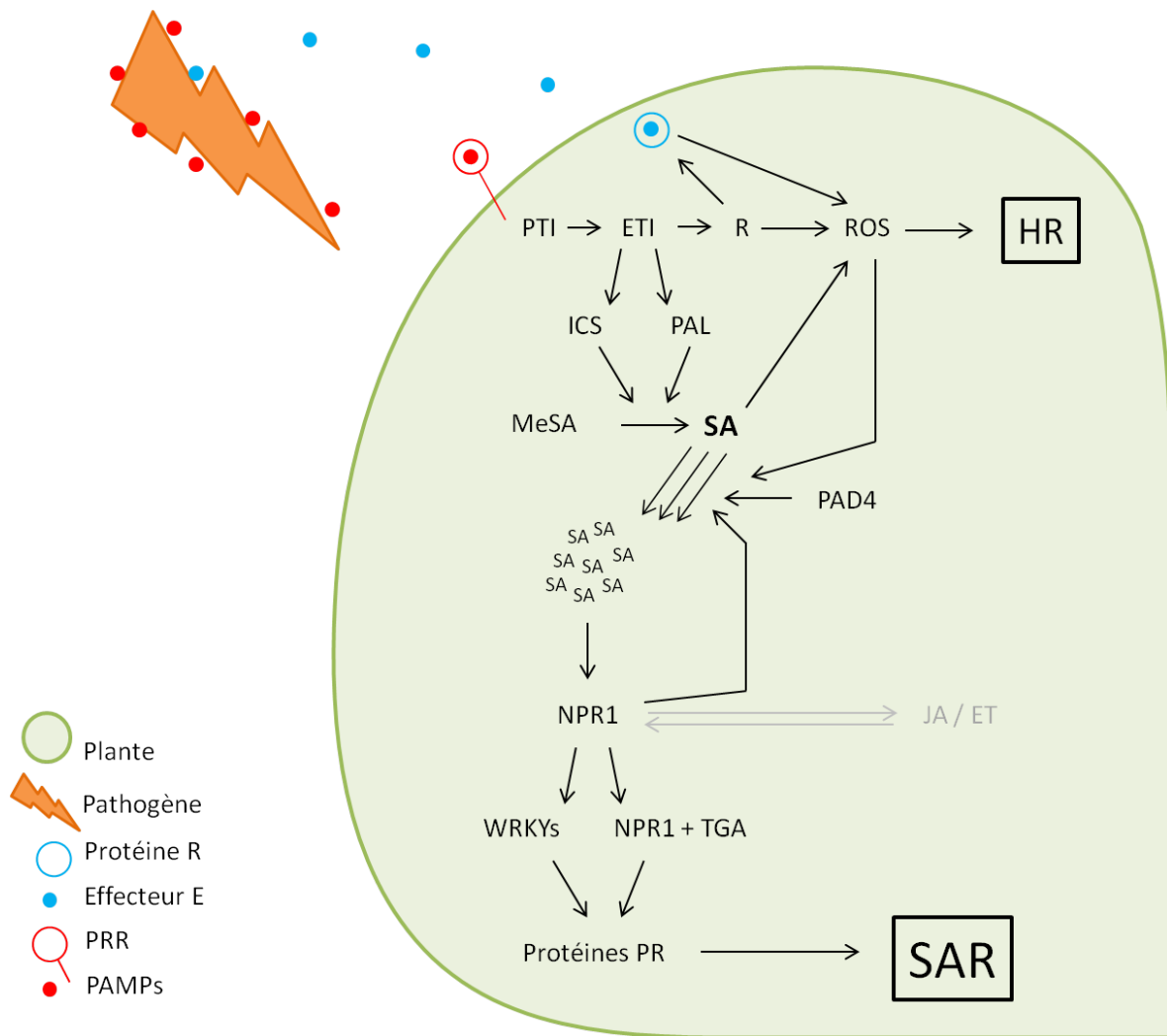


Figure 9 - Mécanisme de défense : Réaction d'Hypersensibilité (HR) et Résistance Systémique Acquise (SAR), d'après Dutt et al., (2015)

Lors d'un stress, qu'il soit biotique ou abiotique, la concentration de SA augmente dans la plante et agit comme un signal permettant d'induire l'expression de gènes impliqués dans la défense au stress dans toute la plante. Il a été montré que l'acide salicylique permettait d'améliorer la production d'antioxydants pour maintenir les ROS à un niveau minimal dans les racines après attaques de pathogènes (Belkadhi et al., 2013).

Suite à l'accumulation de SA, il y aura activation d'un des gènes les plus importants dans la voie de signalisation de la SAR. C'est le gène *NPR1*. Ce gène participe à l'accumulation de SA mais permet aussi à la plante de résister à la toxicité de la phytohormone (Durrant & Dong, 2004). Les protéines NPR1 vont impliquer les *TGA* (Johnson et al., 2003) qui sont des facteurs de transcriptions de type bZIP régulant l'expression des gènes *PR* et donc de la production de protéines liée à la pathogénicité (Fu & Dong, 2013; Liu et al., 2016). Les protéines NPR1 participent également à l'activation des facteurs de transcriptions WRKY qui

permettent d'induire la production de protéines R. L'hormone SA et les protéines permettent à la plante d'être protégée d'une seconde attaque pendant plusieurs jours voire semaines, en instaurant une sorte de mémoire immunitaire. Des régulations épigénétiques font que la SAR peut également être transmise à la descendance, le temps de quelques semaines. La SAR est associée à la survie cellulaire, contrairement à l'ETI qui engendre la mort cellulaire. Le gène *NPR1* est considéré comme étant un des gènes les plus importants dans la mise en place de la SAR.

Les études telles que celle réalisée par Fu & Dong, (2013) ont montré que les gènes paralogues de *NPR1*, *NPR3* et *NPR4* pouvaient être également des récepteurs à l'acide salicylique chez les plantes. Néanmoins, une étude indiquerait que les gènes *NPR3* et *NPR4* auraient un rôle opposé à celui de *NPR1*. En effet, ces gènes auraient tendance à supprimer de façon constitutionnelle l'action de SA alors que *NPR1* permettrait d'exprimer les gènes induits par SA (Ding et al., 2018).

### **1.2.3. Acide jasmonique (JA) et éthylène (ET)**

Le gène *NPR1* permet de faire le lien avec d'autres voies de signalisation de SA et les voies du de l'acide jasmonique (JA) (Ruan et al., 2019) et de l'éthylène (ET) (Broekaert et al., 2006) qui confèrent des résistances à certains insectes et pathogènes nécrophiles (Durrant & Dong, 2004). En effet, l'acide jasmonique, et ses dérivés appelés jasmonates, est une hormone dérivée de l'acide gras  $\alpha$ -linoléinique et agit conjointement avec l'éthylène qui est une hormone végétale, un gaz hydrocarbure dérivé de l'acide aminé méthionine. Après l'attaque d'un pathogène, ou même d'un herbivore, une accumulation importante mais transitoire du JA se produit à l'endroit où la blessure aura été faite conférant ainsi une défense localisée. L'acide jasmonique, tout comme l'acide salicylique, sera converti en jasmonate de méthyle (MeJA) et pourra ainsi être transmis par voie aérienne entre les feuilles endommagées ou non. Il pourra également être transmis entre les plantes adjacentes. L'utilisation de phytohormone reste une stratégie dans la défense contre les nuisibles et la perte de production des vergers (Poveda, 2020).

### **1.2.4. Acide abscissique (ABA)**

Découvert pour la première fois en 1963, l'acide abscissique (ABA) est également une phytohormone. Elle est synthétisée à partir d'un caroténoïde intermédiaire qui se trouve dans les chloroplastes ou d'autres plastes (Taiz & Zeiger, 2002). En fonction de sa concentration,

l'acide abscissique aura un double rôle. A faible concentration, l'ABA joue au rôle majeur dans la régulation de l'initiation et du maintien de la dormance des graines et des bourgeons (Baron et al., 2012). A contrario, en cas de stress, la concentration de l'ABA augmente considérablement dans les racines permettant de maintenir le développement racinaires en augmentant la conductivité hydraulique (Barnabas et al., 2007). L'ABA permet alors de limiter l'impact engendré par le déficit hydrique.

Ces différents mécanismes de détoxification – enzymatiques ou non enzymatiques – permettent alors de réguler les ROS induites après les différents stress abiotiques et biotiques et ainsi limiter leur toxicité chez l'organisme végétal. De plus, tous les mécanismes non antioxydants vont permettre également de gérer les différents stress induits par l'environnement pour maintenir le bon développement des plantes.

Néanmoins, malgré tous ces mécanismes de défense, une maladie ravage depuis deux décennies les vergers d'agrumes.

### **1.3. Le Huanglongbing**

#### **1.3.1. Histoire et origine**

Depuis plusieurs années, une maladie est devenue l'un des problèmes phytosanitaires le plus important dans l'agrumiculture : le Huanglongbing. Ce sont les agriculteurs de la région de Chaozhou, à l'est de Canton en Chine, qui donnent le nom de Huanglongbing à la maladie dans leur dialecte ; avec « bing » pour maladie, « long » pour dragon et « huang » pour jaune (Lin, 1956). Ainsi, le HLB est encore appelé maladie du dragon jaune ou citrus greening. Cette maladie s'est propagée et est présente dans le monde entier dans toutes les zones d'agrumes cultivés à l'exception, pour l'heure, du bassin méditerranéen et du Moyen-Orient, même s'ils restent très menacés. Même si des suspicions de plants malades ont eu lieu tout au long du XX<sup>ème</sup> siècle, notamment en Chine, Thaïlande, Philippines, Afrique du Sud, etc., il est indiqué que les premiers symptômes, induits par le HLB, seraient apparus à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle en Chine (Bové, 2006). Depuis les années 2010, le bassin caribéen est touché par la maladie du HLB. En 2012, les premiers symptômes sont décrits en Guadeloupe. Un an plus tard, la FREDON rapporte que ces derniers sont décrits également en Martinique même si son impact semble limité sur l'île.

Lin (1956) montre pour la première fois que la maladie était transmissible par inoculation du greffon, il indique que la cause de cette transmission était sans doute virale. Neuf

ans plus tard, les travaux de McClean & Oberholzer, (1965) montreront que la maladie était transmissible par greffage. En 1967, les travaux menés par Lilian Fraser et ceux de Carpoor indiquent que cette bactérie était transmise par les psylles des agrumes (Bové, 2006). Dans les années 1970, l'observation de microorganismes dans les cellules du phloème a été effectuée et ce n'est qu'en 1984 que Bové et ses collaborateurs décrivent pour la première fois une bactérie à Gram négatif présente dans les cellules du phloème (Bové, 2006).

### **1.3.2. Agents pathogènes et vecteurs de la maladie du Huanglongbing**

Identifiée comme une maladie bactérienne, le microorganisme associé au HLB est une bactérie à Gram négatif nommée *Candidatus Liberibacter* spp. (Bové, 2006). Cette bactérie appartient à la sous division  $\alpha$  des protéobactéries, est exclusivement phloémique et est retrouvée sous forme de bacilles mesurant entre 500 et 2000 nm (Shokrollah et al., 2010) de longueur et 20 à 25 nm de largeur. Les trois espèces connues, décrites dans la taxonomie, ont été nommées en fonction de leur géolocalisation :

- La souche *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) (Bové, 2006) est originaire d'Asie. Retrouvée en Asie, Amérique du Sud, Centrale et au Sud des États-Unis d'Amérique (USA), c'est la souche la plus répandue dans le monde et donc la plus commune. Cette espèce est également responsable de la maladie dans le bassin caribéen (Etienne, 2001).
- *Candidatus Liberibacter americanus* (Lam) (Teixeira et al., 2005; Teixeira et al., 2005) est une souche assez similaire à Las et a été identifiée pour la première fois à Sao Paulo au Brésil en 2005.
- Enfin, on retrouve *Candidatus Liberibacter africanus* (Laf) (Jagoueix et al., 1994) qui se distingue des deux autres souches de par sa sensibilité aux températures (Bové et al., 1974). Cette souche est principalement retrouvée en Afrique du Sud et à l'île de la Réunion et est retrouvée dans les régions en altitude où le climat est frais.

Aujourd'hui, malgré de nombreux travaux de recherche, il n'est toujours pas possible de cultiver les souches de cette bactérie. En revanche, une étude récente (Ha et al., 2019) pourrait être un précurseur dans la culture de la souche asiatique. En effet, cette étude montre qu'il a été possible de cultiver Las à partir d'un inoculum dans des conditions spécifiques à l'aide d'un réacteur à membrane biofilm. Cette étude pourrait être le début du développement à long terme de Las à partir d'une culture pure.

A ce jour, deux vecteurs responsables de la transmission du HLB dans les zones de cultures d'agrumes ont été identifiés. Ces vecteurs sont des insectes piqueur-suceur appelés

psylles d'agrumes :

- Appelé *Trioza erythrae* (Hemiptera : Triozidae) (**figure 10B**), cet insecte à l'âge adulte est responsable de répandre Laf et ne résisterait pas aux températures élevées.
- Le 2<sup>ème</sup> est le psylle asiatique des agrumes (ACP) : *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera : Liviidae) (**figure 10A**). A l'âge adulte, il mesure environ 3 à 4 mm de long et présente un corps brun tacheté et a une inclinaison proche de 30°. Les nymphes de ce dernier mesurent 0,25 mm au 1<sup>er</sup> stade et jusqu'à 1,7 mm au stade 5 (Mead, 2017). C'est à partir des stades 4 ou 5 et à l'âge adulte qu'il sera capable d'acquérir la bactérie lors d'un repas et de la disséminer tout au long de sa vie. *D. citri* permet de répandre Las et sûrement Lam car ce psylle serait présent au Brésil depuis plus de 60 ans (Teixeira et al., 2005).

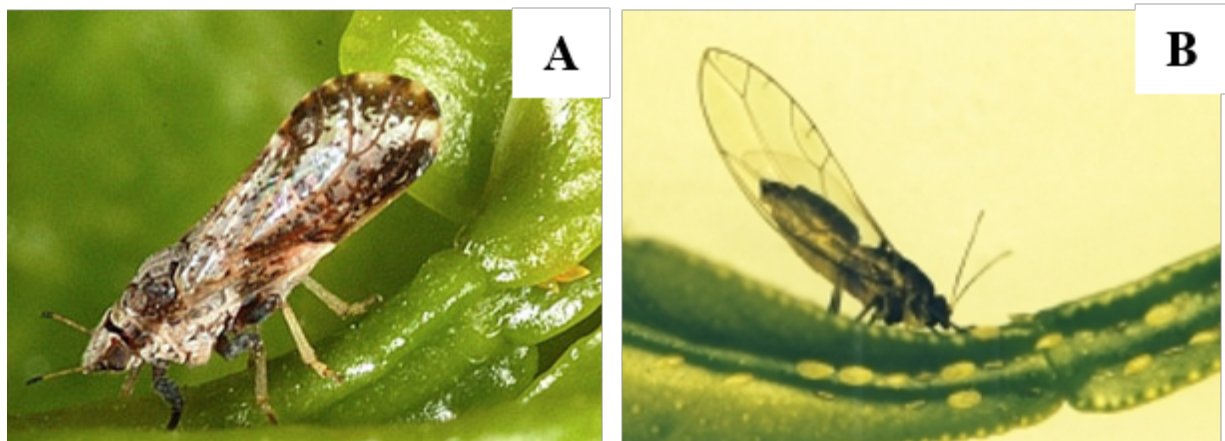


Figure 10 - *Diaphorina citri* au stage adulte (A) (Cadwell, (1998)) et *Trioza erythrae* au stage adulte (B) (Gobierno de Canarias)

Bien que le psylle africain ne soit présent qu'en Afrique, il semblerait que la présence du psylle asiatique ait été observée dans plusieurs régions africaines dont notamment le Kenya et d'autres régions de l'est de l'Afrique. (Ajene et al., 2020). Avec la présence de cet insecte, les risques de contaminer des parcelles d'agrumes augmenteraient avec la possibilité de pouvoir transmettre la souche asiatique.

### 1.3.3. Stratégie de lutte contre le HLB

La perte de production des agrumes due au HLB est considérable à l'échelle mondiale. Néanmoins, il existe différents moyens de lutte contre le HLB qui ont pour l'heure un impact plus ou moins limité.

### 1.3.3.1. Lutte chimique

Un an après la découverte de la maladie au Brésil, il a été rendu obligatoire d'éliminer les arbres symptomatiques même si cela n'a pas été fait de manière rigoureuse par tous les agriculteurs (Lopes et al., 2007). En Floride – et même au Brésil – la lutte chimique reste très fortement employée afin de limiter les populations de psylles mais cette technique rencontre des limites suite au phénomène de résistance. A cela, il faut ajouter que les auxiliaires des psylles restent sensibles aux produits chimiques et pourraient disparaître plus rapidement que les psylles.

### 1.3.3.2. Lutte biologique

Aux Antilles, la lutte biologique est préconisée avec l'intervention de *Tamarixia radiata*. Dès l'apparition du psylle vecteur du HLB en Guadeloupe en 1998, il y aura introduction de la micro-guêpe *T. radiata* en 1999. Les larves de *T. radiata* vont pondre leurs œufs à l'intérieur des larves de *D. citri*. Elles vont ensuite se nourrir des larves du psylle et donc parasiter ces dernières (**figure 11**) (Étienne et al., 2001). Elle a la capacité de parasiter tous les stades larvaires de *D. citri*. Afin de favoriser la présence de cette micro-guêpe, il est conseillé de diminuer les produits phytosanitaires et de privilégier des zones de refuges comme des haies ou encore des bandes fleuries.



Figure 11 - Larve de psylle de *D. citri* (gauche) parasitée par *T. radiata* (droite) origine photo ?

Il est également conseillé de détruire, aux alentours des zones de cultures, les arbres hôtes des psylles tels que l'oranger jasmin (*Murraya paniculata*) ou encore *Triphasia trifolia*. Néanmoins une étude a montré récemment que l'oranger jasmin pouvait être un moyen de piéger les psylles vecteurs de la maladie afin de les éradiquer. En effet, en plantant de l'oranger jasmin et en le traitant avec des insecticides, il est possible d'attirer et tuer *D. citri* pour éviter sa dispersion de, permettant ainsi de diminuer la cause primaire de la propagation du HLB (Tomaseto et al.,

2019). L'étude de Ramadugu et al., (2016) a révélé néanmoins que des apparentés d'agrumes pourrait être résistants à la maladie car aucune détection de la bactérie ne serait faite même après deux ans d'infection. Dans la mesure où ils sont sexuellement compatibles, envisager un croisement entre apparentés et agrumes cultivés serait une stratégie afin de créer et sélectionner des arbres résistants à la maladie.

En plus des arbres hôtes, l'élimination des parcelles infectées peut faire l'objet d'une stratégie contre le HLB, bien qu'elle reste coûteuse car elle reste liée à une perte considérable de production (Gottwald, 2010). Il a été montré qu'en protégeant les agrumes avec des éliciteurs de défense des plantes, de l'engrais azoté, du compost ou encore de la thérapie thermique, il était possible de protéger les arbres faiblement malades (Li et al., 2019). Enfin, il est possible de déplacer les cultures vers des zones plus fraîches pour limiter l'impact du psylle, cependant les conditions restent moins optimales pour les agrumes réduisant ainsi la production.

### **1.3.3.3. Implication du génome dans la réponse au Huanglongbing**

L'implication de la SAR (*cf 1.2.2. Réaction d'hypersensibilité (HR) et de résistance systémique acquise (SAR)*) montre que l'expression de certains gènes des plantes pourrait être un outil de tolérance face à des pathogènes et donc au HLB. En plus des gènes comme le *NPR1* qui ont une importance clé dans l'induction de la SAR, d'autres gènes et protéines semblent être impliqués dans la défense et le développement des plantes. La superfamille du cytochrome P450 (CYP) est impliquée dans les mécanismes de défenses suite à différents stress biotiques et abiotiques (Xu et al., 2015). Cette superfamille est aussi retrouvée chez les mammifères, que chez les insectes, les bactéries et plus encore. En fonction de la famille, les fonctions des CYP seront différentes. En effet, si *CYP77A19* et *CYP77A20* interviennent dans la biosynthèse de certains composés de la paroi cellulaire (Grausem et al., 2014) qui reste l'une des premières barrières contre les pathogènes (Staelin, 2019), d'autres CYP, comme *AtCYP709B*, jouent un rôle dans l'ABA et la réponse au stress salin (Mao et al., 2013).

L'étude de Wang et al., (2016) a montré l'implication de gènes tels que *NPR1*, *DMR6*-like ou encore la lipoxygénase (LOX) pouvant être impliqués dans la tolérance au HLB dans le cadre d'une comparaison entre un pomelo hybride Jackson – qui semblait plus tolérant – face à un pomelo Marsh plus sensible. Il a été montré que des gènes de résistance constitutive aux maladies (CDR) pouvaient être impliqués dans la tolérance aux HLB chez le genre *Citrus* et *Poncirus* (Rawat et al., 2017). De plus, la majorité des gènes CDR codent pour des protéines à répétitions riches en leucine et à des sites de liaison aux nucléotides (NBS-LRR). Elles

représentent la plus grande famille des protéines de résistance (Liu et al., 2019; Meyers et al., 2003). L'importance des protéines riche en leucine (LRR) est qu'elles sont impliquées dans la détection de diverses pathogènes comme les bactéries ou encore les champignons (McHale et al., 2006).

L'importance de certaines hormones face à certains pathogènes a déjà été montré (Belkadhi et al., 2013; Durrant & Dong, 2004). En effet, l'étude de Nehela et al., (2018) a montré que les hormones telles que SA (*cf 1.2.2. Réaction d'hypersensibilité (HR) et de résistance systémique acquise (SAR)*) et JA (*cf. 1.2.3. Acide jasmonique (JA) et éthylène (ET)*), qui sont des hormones importantes dans la réponse aux pathogènes, avaient une concentration plus importante chez les plants infectés par le HLB par rapport aux plants témoins. L'utilisation de plants avec une expression de gènes qui permettent une meilleure tolérance face à la maladie du HLB serait alors une des voies de lutte contre la maladie.

#### 1.3.4. Symptômes de la maladie

En général, suite à différents stress comme des blessures, stress physiologiques ou encore des attaques par des pathogènes, les plantes vont fortement bio-synthétiser un  $\beta$ -glucane appelé callose (Chen & Kim, 2009; Stone & Clarke, 1992). La piqûre induite par le psylle au niveau des tissus conducteurs de la feuille et l'intégration de la bactérie dans les vaisseaux du phloème va induire une forte synthèse de callose (**figure 12**) au niveau des pores des cellules cribles du phloème (Achor et al., 2020; Koh et al., 2012) empêchant les flux de la sève élaborée. De plus, la bactérie aura tendance à coloniser la plante bien avant l'apparition de symptômes visibles (Folimonova & Achor, 2010).

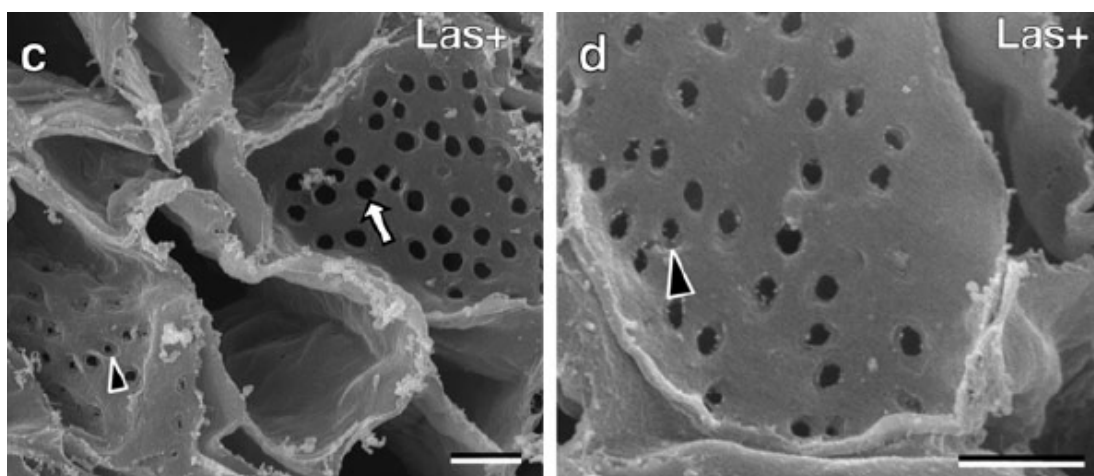


Figure 12 - Dépôt de callose (flèche noire) au niveau des pores (flèche blanche) des cellules cribles du phloème (Koh et al., 2012)



### 1.3.4.1. Impact de la maladie du Huanglongbing au niveau foliaire

Pouvant être considérées comme l'une des parties les plus importantes de l'arbre, les feuilles sont essentielles dans la production de carbohydrates résultant du processus de photosynthèse. La photosynthèse est un mécanisme complexe pouvant être sous divisée en deux parties avec dans un premier temps les réactions lumineuses qui sont conduites par des électrons et passent par différents complexes protéiques ayant lieux dans les thylakoïdes chloroplastes et dans un deuxième temps, les réactions du cycle de Calvin de fixation photosynthétique du CO<sub>2</sub> dans les stromas des chloroplastes (Baslam et al., 2020; Renger, 2007). C'est au niveau des feuilles qu'il y aura production d'amidon afin d'alimenter les organes puits via la sève élaborée. En fonction de ses besoins biologiques, l'amidon est catégorisé en 2 types : transitoire ou de stockage. Cet amidon est synthétisé à partir de la photosynthèse le jour et se dégrade la nuit afin de soutenir le métabolisme, la production d'énergie et la biosynthèse en absence de photosynthèse (Pfister & Zeeman, 2016).

Un des symptômes les plus marquants à l'œil nu est celui observé chez les feuilles. En effet, avec l'arrêt des flux de la sève élaborée, les produits de la photosynthèse, comme l'amidon, ne peuvent être transportés vers les organes puits tels que les racines ou encore les fruits et s'accumulent au niveau des feuilles (**figure 13**) (Achor et al., 2010; Etxeberria et al., 2009; Etxeberria & Narciso, 2015).

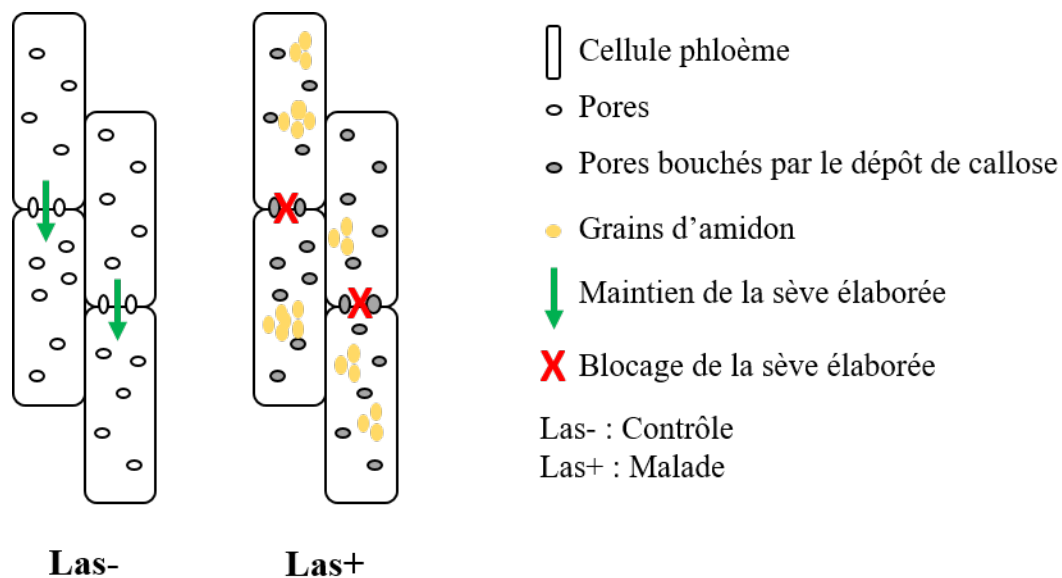


Figure 13 – Différence physiologique au niveau des cellules du phloème entre plants infectés (Las+) ou non (Las-) par Las.

Il a été montré que le saccharose s'accumule plus régulièrement que l'amidon, le glucose ou encore le fructose chez les feuilles infectées par Las durant les saisons chaudes et froides (Weng et al., 2018). Ce phénomène d'accumulation des sucres et de l'amidon est alors caractérisé par l'apparition de marbrures jaunâtres et asymétriques de part et d'autre de la nervure centrale des feuilles matures (**figure 14A**) (Bové, 2006).



Figure 14 - Symptômes foliaires induits par le HLB (a) ou par une carence en métaux (b)

Néanmoins, les symptômes foliaires induits par le HLB peuvent être rapidement confondus avec ceux induits par une carence en métaux comme le zinc ou le fer. Ces symptômes restent tout de même différenciables car une carence en nutriments va entraîner la présence de marbrures jaunâtres symétriques par rapport à la nervure centrale de la feuille (**figure 14B**) (Weir, 2003). Un arbre infecté par le HLB peut présenter à la fois, au hasard au niveau de la canopée, les symptômes dus à la maladie mais également ceux dus à une carence en nutriments. Généralement, les arbres infectés par le HLB ont tendance à avoir des feuilles plus petites que celles des arbres témoins. Cependant, les feuilles infectées peuvent parfois être plus épaisses et plus fermes que celles ne présentant pas de HLB. La distribution aléatoire des symptômes foliaires est due à la répartition irrégulière de la bactérie dans l'arbre.

En plus de l'assimilat important d'amidon et des différents sucres, au fur et à mesure que la maladie progresse, le phloème aura tendance à s'affaïsser et s'effondrer afin de créer une barrière de parois cellulaires quasi solide, par rapport aux cellules de phloème issues de feuilles de plants sains (Etxeberria & Narciso, 2015). L'étude de Deng et al., (2019) a montré que certaines variétés, notamment le citron « Bearss », présentaient moins de dommages au niveau de leur phloème et avaient une plus grande capacité à renouveler leur phloème par rapport aux

variétés dites plus sensibles. Ce résultat est en accord avec un taux d'amidon moins élevé observé dans les feuilles des variétés les plus tolérantes.

De plus, les arbres infectés par la bactérie produisent pendant un certain temps des fruits plus ou moins propres à la consommation, signifiant ainsi un moyen alternatif de transports des assimilats vers les autres organes de la plante.

#### 1.3.4.2. Impact du Huanglongbing sur les fruits

Les autres symptômes marquants et observables à l'œil nu sont ceux observés chez les fruits. Lorsqu'un arbre est atteint par la maladie du HLB, ses fruits sont généralement plus petits, présentent forme anormale (Bassanezi et al., 2009) et restent parfois verts sur certaines parties même lorsqu'ils sont mûrs. C'est ce qu'on appelle le « verdissement » (**figure 15A**), d'où « citrus greening » en anglais. En plus de ce verdissement, au niveau interne, les fruits vont présenter des graines avortées, un axe courbé ou encore une couleur jaunâtre, voire même brunâtre au niveau de leur columelle (**figure 15B**). De plus, la couleur de la peau des agrumes semblent plus clairs lorsqu'ils sont infectés par la bactérie (Bassanezi et al., 2009; Dala-Paula et al., 2019; Koh et al., 2020).

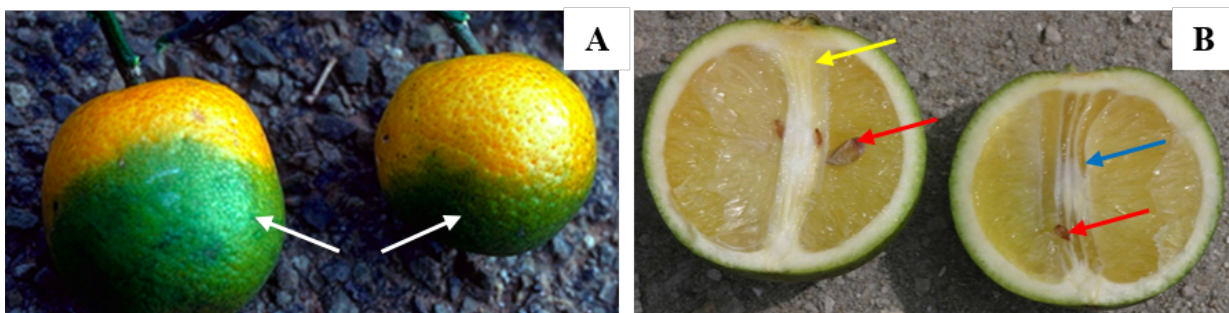


Figure 15 - Zone verte sur un fruit d'agrumes infecté par Las (A). Coupe interne d'un fruit infecté par Las (B). Flèches blanches : verdissement ; flèches rouges : graines avortées ; flèche jaune : couleur jaunâtre au niveau de la columelle, flèche bleue : axe courbé

Généralement, les fruits malades sont impropres à la consommation. Le blocage des assimilats vers les fruits vont engendrer une altération gustative de ceux-ci. Des études, comme celles de Bassanezi et al., (2009), montrent que les fruits ont tendance à être généralement plus acides que les fruits sains. En effet, le taux en saccharose (Brix) des fruits sera significativement plus bas par rapport aux fruits sains, rendant ces fruits beaucoup plus acides. De plus, cette étude a mis en évidence que la perte relative de la qualité des fruits dans différents cultivars d'oranges douces pourrait être liée à leur âge et que les cultivars précoces et de mi-saison seraient

possiblement plus tolérants que ceux en fin de saison. Enfin, l'aigreur et l'amertume retrouvés chez les fruits infectés sont dues par les composés comme les limonoïdes ou encore les flavonoïdes amers ainsi que les acides organiques (Dala Paula et al., 2018).

#### **1.3.4.3. Impact du Huanglongbing sur le massif racinaire**

Les racines, tout comme les feuilles, sont un élément clé dans le maintien du développement de l'arbre. Le système racinaire primaire des agrumes comprend des racines latérales verticales et horizontales ligneuses. Ce sont ces racines qui vont assurer l'ancrage et le soutien dans le sol. De plus, elles vont servir de conduit pour le transport des nutriments et de l'eau. Les racines latérales, plus petites et les plus subtiles, sont une masse de racines plus fines appelées racines fibreuses qui fournissent l'essentiel de l'eau et de l'absorption des nutriments. La majeure partie de la masse racinaire fibreuse réside à moins de 60 à 75 cm de la surface du sol (Freeland, 2016). Chez les agrumes, ces racines fibreuses ont différents niveaux de plasticité pour l'acquisition de nutriments, l'accumulation de biomasse et les réponses morphologiques et physiologiques lors de divers stress environnementaux (Rewald et al., 2012; Sorgonà' et al., 2007). Les racines inférieures sont caractérisées par leur capacité d'absorption, leur taux de respiration et leur concentration en azote plus élevés. Cependant, les racines supérieures sont caractérisées par leur capacité de transport, leur durée de vie, leur cellulose et leurs glucides (McCormack et al., 2015; Rewald et al., 2012).

Même si les recherches sur le système racinaire des agrumes atteints du HLB sont plus limitées que celles faites sur la canopée, des études comme celle de Li et al., (2009) ont montré que la bactérie peut se retrouver dans toutes les parties de l'arbre contenant du phloème et donc dans les racines. En 2013, Johnson et al., a montré que les racines pouvaient être un réservoir de Las. Les résultats de cette étude ont montré que la population de la bactérie était plus constante au niveau racinaire qu'au niveau foliaire démontrant ainsi l'implication des racines dans le développement et la multiplication de la bactérie. De plus, une relation pouvait être établie entre la présence de la bactérie au niveau des racines et la présence de la bactérie chez les nouvelles pousses feuillées. En effet, des analyses quantitatives ont démontré que la charge bactérienne racinaire diminuait après l'apparition de nouvelles pousses feuillées, indiquant un déplacement de la bactérie des racines vers les feuilles. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait qu'au niveau des racines, la réaction de la plante semble différente. Contrairement à la forte synthèse de callose observée au niveau des cellules cribles du phloème des feuilles, aucun dépôt de callose n'est retrouvé au niveau du phloème des racines (Achor et al., 2020). Bien que le

système racinaire soit plus difficile à analyser que la canopée, il a été proposé que la dégradation du massif racinaire aurait lieu beaucoup plus tôt que les symptômes observés chez les feuilles (Graham et al., 2013), ceci réduisant le massif racinaire viable (**figure 16**) (Kumar et al., 2018). Ainsi, la maladie va provoquer une perte d'environ 30 à 50% des racines fibreuses de l'arbre avant même que les symptômes de la canopée ne soient visibles (Johnson et al., 2013). Contrairement aux feuilles, où Las aurait une action indirecte (callose, bouchage, augmentation de la concentration d'amidon) sur les symptômes observés, la bactérie aurait une action directe sur les racines entraînant ainsi leur mort. En effet, malgré l'enrichissement en amidon des cellules corticales des racines secondaires, une observation du déclin du système racinaire peut être observé, ceci suggérant que les hydrates de carbone solubles ne sont pas un facteur limitant dans la perte du système racinaire (Kumar et al., 2018).



Figure 16 - Racines infectées (B) ou non (A) par Las

*In fine*, le HLB entraînera la chute des feuilles, des fruits et la destruction des racines menant ainsi à une mort plus ou moins rapide de l'arbre.

# ***PROBLÉMATIQUE***



L'UMR AGAP (Unité Mixte de Recherche Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales) qui fait partie du CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) comprend de nombreuses équipes scientifiques dont l'équipe SEAPAG (Structure Evolutive des Agrumes, Polyploïdie et Amélioration Génétique). L'objectif de cette équipe est de développer des variétés et des porte-greffes d'agrumes adaptés à des systèmes de production et de commercialisation durables. Par durable, il est question de matériel végétal résistant ou tolérant à certains bio-agresseurs (notamment le HLB) mais aussi adapté aux diverses contraintes environnementales. L'équipe SEAPAG a coordonné le projet 'CAVALBIO' (CAractérisation et VALorisation de la BIODiversité végétale tropicale d'intérêt agronomique ; 2015 - 2021) qui contribue au développement de filières ignames et agrumes durables. Ce projet a été financé par l'Union Européenne (FEDER) et la région Guadeloupe.

Face à la contrainte du HLB qui entraîne une baisse considérable des productions d'agrumes dans le monde entier (FAO, 2017), mon sujet de thèse avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la meilleure tolérance des agrumes polyploïdes face au HLB par rapport aux agrumes diploïdes. Cette thèse a fait l'objet d'un financement par la CTM (Collectivité Territoriale de Martinique).

Les travaux antérieurs du collectif Agrumes au CIRAD ont permis de montrer que la polyploïdie, notamment la tétraploïdie, conduit à une augmentation de la taille des organes, de la taille des cellules et des vaisseaux (Allario et al., 2011). L'augmentation de taille des cellules chez les triploïdes (3x) et 4x (Corneillie et al., 2019; Lourkisti et al., 2021) pourrait donc limiter l'impact des dépôts de callose lors de l'infection par le HLB et pourrait permettre le maintien des flux de sève phloémique.

Dans le cadre de ma thèse, il m'a été proposé d'évaluer l'impact du HLB sur différentes associations de greffons/porte-greffes avec des niveaux de ploïdie différents. Ces associations greffons/porte-greffes ont été mises en place dans un dispositif en serre et au champ, les greffons utilisés étant infectés ou non par le HLB :

- Limettier Tahiti 3x / Citrumelo 2x (**LT3x / Cit2x**)
- Limettier Tahiti 3x / Citrumelo 4x (**LT3x / Cit4x**)
- Limettier Mexicain 2x / Citrumelo 2x (**LM2x / Cit2x**)
- Limettier Mexicain 2x / Citrumelo 4x (**LM2x / Cit4x**)

Dans le **Chapitre 1**, le travail a été axé sur la partie aérienne (canopée) des plants. L'étude a été conduite uniquement sur les associations LM/2x et LT/Cit2x. Les échantillons de feuilles témoins et de feuilles asymptomatiques ont été prélevés sur des plants en serre inoculés par greffage. Les échantillons de feuilles symptomatiques ont été prélevés sur des arbres au champ (inoculation naturelle par des psylles) dans la mesure où il était difficile d'obtenir de tels symptômes en serre.

Grâce à ces différents greffons et porte-greffes, il m'a été proposé de caractériser l'impact que peut avoir la polyploïdie sur la tolérance des différentes associations suite à une infection par la bactérie responsable du HLB.

Différentes questions se posaient à nous : comment se comporte le LM et LT au niveau physiologique ? Le dépôt de callose est-il plus important chez les diploïdes que chez les polyploïdes ? Les mécanismes de défenses sont-ils différents chez les polyploïdes ? Sont-ils plus efficaces chez les polyploïdes ? A quel moment entrent-ils en jeu ? Connaître les différents facteurs qu'apporte la polyploïdie devait permettre ainsi de comprendre pourquoi les polyploïdes sont plus tolérants au HLB.

Dans un premier temps, il a fallu vérifier par PCR quantitative que les plants potentiellement infectés par greffage en serre avaient bien été infectés par le HLB. Dans un second temps, j'ai initié l'analyse de la présence de callose sur des échantillons de pétiole de feuilles asymptomatiques de limettiers 2x et 3x greffés sur des porte-greffes 2x. En effet des analyses réalisées précédemment sur des pétioles de feuilles 2x et 3x symptomatiques (forte marbrures foliaires) ont montré des contenus en amidon très importants mais sans différence significative entre les deux génotypes. De même, les analyses par microscopie à balayage n'avaient pas révélé de différence, les pores entre cellules du phloème 2x et 3x étant bouchés par de la callose. Réaliser des analyses sur des feuilles asymptomatiques avait donc pour but de vérifier si les pores des cellules du phloème des 3x étaient moins bouchés que ceux des 2x et ensuite confirmer la quantification du dépôt de callose à l'aide d'une coloration au bleu d'aniline.

Le HLB induit également un stress oxydatif. Ce stress oxydatif sera alors caractérisé par une augmentation de ROS qui sont toxiques et donc néfastes pour la plante lorsqu'elles sont produites en excès. Afin de vérifier si une surproduction de ROS était plus importante chez les diploïdes que chez les polyploïdes, des dosages de différentes ROS ont été réalisés. De plus, il a fallu vérifier également si le processus de détoxification, et donc d'élimination des ROS, était plus efficace en fonction du niveau de polyploïdie, il a été important de réaliser certains dosages biochimiques afin de connaître la réponse des 2x et 3x face à la maladie.



Suite à cette étude sur le compartiment aérien, pour le **Chapitre 2**, l'étude a été axée sur l'analyse de porte-greffes Citrumelo Swingle 4475 2x et 4x. Aujourd'hui, même s'il semblerait que le massif racinaire soit un lieu de multiplication et de développement de la bactérie (Johnson et al., 2013), l'impact que peut avoir la bactérie, et donc de la maladie, sur le système racinaire reste une zone d'ombre. Cette étude avait pour objectif de pouvoir identifier des différences physiologiques entre ces deux porte-greffes. Tout comme pour la partie aérienne, il a fallu vérifier si les plants greffés étaient bien infectés par Las. Il a été important de déterminer s'il y avait une possibilité d'observer de la callose au niveau du phloème des racines. Et si oui, est-ce qu'il y avait une différence entre les différents géotypes ? Ensuite, la quantification de ce dépôt sera faite par la coloration au bleu d'aniline sur les racines de ces porte-greffes. L'analyse des capacités antioxydantes des porte-greffes d'agrumes face à différents stress est généralement réalisée sur des feuilles issues de la canopée de ces derniers. Comme les agrumes ne sont plus cultivés de franc-pied, il était aussi important de connaître la réponse des racines des porte-greffes en ce qui concerne une possible augmentation de ROS due au HLB. Ainsi, afin d'explorer le plus large potentiel antioxydant de ces agrumes, un dosage des composés polyphénoliques sur les racines de porte-greffes d'agrumes 2x et 4x couplée à une analyse électrochimique a également fait l'objet d'une étude.

Enfin, après avoir travaillé de façon « indépendante » sur chaque compartiment, racinaire ou foliaire, l'étude du **Chapitre 3** s'est portée aussi bien au niveau foliaire qu'au niveau racinaire par des analyses de l'expression des génomes. En effet, le but de ce chapitre était de déterminer l'impact de la ploïdie des génomes dans la réponse à la maladie du HLB. Comme il a été dit précédemment, des études ont montré que certains géotypes sont plus tolérants au HLB grâce à une concentration accrue de SA, ou encore JA, impliquée elle-même dans la signalisation du gène *NPRI*. Une étude récente (Nehela et al., 2018) a montré que la concentration en acide salicylique augmentait de façon considérable chez les plants infectés par la bactérie responsable de la maladie du dragon jaune.

De ce fait, les analyses du transcriptome, des hormones et du métabolome ont été faites sur l'ensemble des associations avec des niveaux de ploïdies différents (2x/2x ; 2x/4x ; 3x/2x ; 4x/4x). Toutes ces analyses permettront de mettre en exergue des gènes différentiellement exprimés (GDE) qui seront parfois synonyme d'une meilleure tolérance au HLB. Ainsi, tout comme les précédents chapitres, il sera possible d'analyser si la polyploïdie augmente la tolérance face à cette maladie. Ces résultats, couplés aux analyses hormonales, devraient permettre de vérifier si des hormones clés, comme l'acide salicylique ou encore la lipoxigénase

notamment, sont bien synthétisées afin de se défendre contre la bactérie et tous les processus qu'elle engendre. Grâce à ces différents dosages, un lien pourra être éventuellement mis en relation avec les données de RNAseq obtenues. De plus, il est indiqué que certains métabolites étaient retrouvés dans les arbres tolérants à la maladie du HLB (Suh et al., 2021) et que les porte-greffes pouvaient influencer la composition de certains métabolites au niveau des feuilles (Albrecht et al., 2019). Des analyses de spectroscopie à résonance magnétiques nucléaires vont permettre d'identifier différents métabolites et permettre également de connaître l'impact de la polyploïdie vis-à-vis du HLB par rapport à la composition des métabolites au niveau des feuilles et des racines.

## ***2. MATÉRIELS ET MÉTHODES***

## 2.1. Matériel végétal

Durant ces années de thèse, mon travail s'est porté sur 4 associations variétés/porte-greffes différentes issues de trois agrumes : limettier Mexicain 2x (*Citrus aurantiifolia*), limettier Tahiti (*Citrus Latifolia*) et citrumelo Swingle 2x ou 4x (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata*). Les 4 associations étaient infectées ou non par *Candidatus Liberibacter asiaticus* et étaient les suivantes :

- Limettier Mexicain (2x) x Citrumelo 2x = LM/Cit2x
- Limettier Mexicain (2x) x Citrumelo 4x = LM/Cit4x
- Limettier Tahiti (3x) x Citrumelo 2x = LT/Cit2x
- Limettier Tahiti (3x) x Citrumelo 4x = LT/Cit4x

L'INRAE-CIRAD de San Giuliano en Corse (France) a fourni des graines diploïdes de Citrumelo (SRA 928 ; *Citrus sinensis* [L.] Osbeck x *Poncirus trifoliata* [L.] Raf) provenant de la collection du centre de ressources biologiques "CRB Citrus" (Luro et al., 2017). Les plantules ont été plantées dans du substrat et ont été conservées en serre pendant 10 mois. L'état de ploïdie de 2 plantules a été vérifié et confirmé par cytométrie en flux (Partec I) selon Froelicher et al., (2007). La conformité génétique des plantules a été confirmée en utilisant les marqueurs SNPs développés par Bruyère et al., (2016).

Les arbres témoins et infectés de chaque génotype ont été cultivés dans des pots de 40 L dans des serres proches, mais distinctes, pendant 18 mois, avec des températures diurnes et nocturnes de 25-32 °C et 22-28 °C respectivement, et une humidité relative variant entre 70 et 98%. Ces arbres ont été utilisés pour l'étude des études physiologiques, microscopiques et biochimiques. Des observations concernant les symptômes de la maladie de HLB et une collection de feuilles symptomatiques (Las+S) ont été effectuées sur les mêmes combinaisons de porte-greffe et de variété de 4 ans plantées en plein champ et infectées naturellement pendant 2 ans.

## 2.2. Technique Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

La méthode d'amplification LAMP a été mise au point par Notomi et al., (2000). Pour notre étude nous avons utilisé des kits « DNABLE Molecular Detection for HLB *Liberibacter asiaticus* » développées par la société Envirologix. Ces tests moléculaires permettent d'indiquer la présence ou non de la bactérie responsable du HLB dans le pétiole des feuilles. La méthode LAMP est une méthode dérivée de la réaction en chaîne par polymérase (PCR), la réaction étant réalisée à température constante, 55°C. Il est à noter que cette méthode, bien que très sensible est qualitative et ne permet pas d'estimer la charge bactérienne d'un échantillon.

Elle a été utilisée principalement pour les témoins afin de vérifier le niveau phytosanitaire négatif de ces échantillons.

### **2.3. Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)**

La quantification de la bactérie responsable du HLB dans des échantillons de pétioles de limettier Mexicain et limettier Tahiti a été réalisée par PCR quantitative à temps réel. Afin de réaliser la PCR quantitative, une extraction d'ADN de la bactérie a été faite à l'aide du kit « Qiagen DNAeasy plant mini kit ». La qPCR a été réalisée selon la méthode de (Li et al., 2006) et a été faite à partir de 2 $\mu$ l d'ADN pour un volume réactionnel de 11 $\mu$ l.

### **2.4. Analyses comportement physiologique sur pétioles de limettier Mexicain 2x et limettier Tahiti 3x**

Les mesures des taux de photosynthèse nette, de conductance stomatique et de transpiration ont été réalisées à l'aide d'un système infrarouge d'analyse de gaz (IRGA) (ADC LCpro, Royaume-Uni) et sous un rayonnement photosynthétique croissant de 200 à 2000  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Les mesures ont été effectuées le matin (7 h à 9 h) pour éviter une température extérieure élevée sur 3 feuilles présentant un même stade de développement situées dans la partie médiane de l'arbre.

### **2.5. Microscopie Électronique à Balayage (MEB) sur pétioles de limettiers Mexicain 2x ; limettier Tahiti 3x ; racines de Citrumelo Swingle 2x et 4x**

Plusieurs segments transversaux de pétioles de limettiers Mexicain (LM, 2x) et Tahiti (LT 3x) ont été découpés. Ces échantillons ont été immergés une nuit dans du glutaraldéhyde à 2,5%. Ces échantillons ont subi différents lavages dans du tampon phosphate et de l'eau distillée et ensuite une déshydratation à l'acétone. Les échantillons de LM et LT ont été ensuite analysés par microscopie électronique à balayage après avoir subis un point critique et une métallisation au laboratoire C3MAG de l'Université des Antilles – Pôle Guadeloupe (Campus Fouillole). La MEBE utilise des électrons et non des photons (cas de la microscopie optique). Le pouvoir de résolution est plus grand car les longueurs d'ondes utilisées sont plus faibles qu'une microscopie photonique permettant ainsi de distinguer des détails plus fins.

La même méthode a été réalisée pour des coupes transversales et longitudinales de racines de Citrumelo Swingle 4475 2x et 4x.

## **2.6. Coloration au bleu d'aniline sur pétioles de limettiers Mexicain 2x ; limettier Tahiti 3x ; racines de Citrumelo Swingle 2x et 4x.**

Plusieurs coupes transversales de pétioles frais ont été réalisées et mises dans du tampon de fixation (formaldéhyde 4%). Ces échantillons ont subi également différents lavages puis ont été déshydratés. La coloration se fait dans une solution de bleu d'aniline à 0.1%. L'observation se fait au microscope optique. Cette coloration au bleu d'aniline permet de marquer certains composés pariétaux comme la callose, ces composés apparaissant blanc en microscopie à fluorescence.

Le même protocole a été réalisé pour des coupes transversales et longitudinales de racines de Citrumelo Swingle 4475 2x et 4x

## **2.7. Dosages biochimiques sur pétioles 2x et 3x**

### **2.7.1. Malonaldéhyde (MDA), indicateur de la peroxydation des lipides**

Ce biomarqueur a été dosé selon la méthode décrite par Léchaudel et al., (2013). Des échantillons de feuilles 2x et 3x ont été placés à l'étuve à 60°C (min 24h) afin de récolter des échantillons secs. Ils ont ensuite été broyés et 1g de matériel a été utilisé pour ce dosage. La formation du complexe acide tio-barbiturique (TBA)-MDA est mesurée par spectrophotométrie. Une première lecture est réalisée à 532 nm puis à 600nm afin d'éliminer un éventuel bruit de fond. Le coefficient d'extinction molaire de  $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a été utilisé pour rapporter les DO à une concentration en  $\mu\text{mole}$  de MDA.g<sup>-1</sup> de protéines.

### **2.7.2. Peroxyde de dihydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), indicateur de stress oxydatif**

Tout comme le dosage du MDA, les échantillons ont été placés en étuve à 60°C puis broyés. 1g de matériel sec a été utilisé pour ce dosage. Le protocole utilisé au cours du stage est une méthode adaptée de Velikova et al., (2000). Elle consiste à mesurer la réaction colorimétrique d'oxydation de l'iodure de potassium (KI) par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en milieu acide. L'absorbance est lue à 350 nm.

### **2.7.3. Catalase (CAT), enzyme du système antioxydant**

La catalase permet d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau. La mesure de l'activité de la catalase est adaptée de la méthode décrite par Aebi, (1984) et 1,5g d'échantillon frais ont été utilisés pour ce dosage. L'activité CAT est estimée en mesurant la diminution de la vitesse de réaction à 240 nm pendant 20 minutes. Le coefficient

d'extinction molaire utilisé est de  $43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **2.7.4. Ascorbate peroxydase (APX), enzyme du système antioxydant**

Le dosage de l'APX a été réalisé selon la méthode proposée par Nakano and Asada (1981). Le dosage a été effectué sur 0,5g de matériel frais. Ici, l'activité a été mesurée à 290 nm. Le coefficient d'extinction molaire est de  $2800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### **2.7.5. Ascorbate total (AsA), antioxydant**

Le dosage de l'AsA total a été effectué selon la méthode de Kampfenkel et al., (1995) et a été réalisé à l'aide d'1,5g de matériel frais. L'absorbance est lue à 525 nm.

#### **2.7.6. Dosage de l'amidon**

Le dosage de l'amidon a été réalisé à partir de méthode de Holm et al., (1986) sur 200mg de matériel végétal séché à l'étuve. C'est une méthode enzymatique basée sur l'hydrolyse des différentes fractions d'amidon en glucose. Ce dernier est dosé par spectrophotométrie via le complexe glucose oxydase/peroxydase. En présence de glucose oxydase, le glucose induit la formation d'acide gluconique et de peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène oxyde un chromogène dont on mesure l'absorbance à 510 nm contre le blanc de la courbe d'étalonnage.

### **2.8. Dosages des composés phénoliques et analyse électrochimique sur racines de Citrumelo Swingle 2x et 4x**

24 échantillons (infectés ou non par Las) de racines de Citrumelo 2x et 4x ont été plongés dans de l'azote liquide puis broyés afin d'être conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ensuite, 500mg de poudre de racines ont été plongés dans 10mL de méthanol pendant 72h puis filtrés afin de récupérer les composés antioxydants dont les polyphénols.

Le dosage des polyphénols a été faite à l'aide du kit « Folin Ciocalteu Phenolic Content Quantification Assay » en suivant les instructions du constructeur.

L'analyse des familles de composés antioxydants a été réalisée par des techniques électrochimique. Ces techniques électrochimiques reposent sur la possibilité d'oxyder/réduire la molécule d'intérêt, convertissant ainsi une information chimique (nature de l'espèce et concentration) en information électrique (courant à un potentiel donné).

L'analyse a été faite selon la méthode de Palmeira-Mello et al., (2020). Chaque échantillon de racine a subi une mesure de réduction et d'oxydation avec l'appareil Bio-Logic SP-300 avec

booster 1A/48V en allant de -1.5V à 1.5V.

## **2.9. Hybridation in situ à fluorescence (FISH) sur racines de Citrumelo 2x et 4x.**

Chaque échantillon de racines fraîches 2x et 4x a été broyé dans 2ml de tampon phosphate (0,1M – pH 7,2). Les échantillons ont ensuite été fixés dans une solution finale de paraformaldéhyde de 4% dans le même tampon pendant 4h à 4°C sur des lames silanisées en chambre humide. La méthode d'hybridation a été faite selon Brissac et al., (2011). Une fois les lames séchées, la sonde cible (Hilf et al., 2013) marquée au cyanine 3 (Las406 : 5'-CATTATCTTCTCCGGCG-3') a été ajoutée pour une hybridation d'une nuit dans une solution de formamide à 20%. Les lames ont été contre-colorées par SYBR Green et montées avec le milieu de montage fluorescent Cytomation (Dakocytomation@, France) avant visualisation sous un microscope à épifluorescence, Eclipse 80i (Nikon@, France).

## **2.10. Extraction d'ARN sur pétioles feuilles de limettiers 2x et 3x et sur racines de Citrumelo 2x et 4x, création de banque et analyse RNAseq**

### **2.10.1. Isolation de l'ADN total, préparation d'ADNc et séquençage**

24 échantillons de feuilles (12 témoins et 12 infectés) de limettiers 2 et 3x greffés avec du citrumelo 2x ou 4x et 24 de racines de porte-greffes 2x et 4x greffés avec des limettiers 2x ou 3x ont été plongés dans de l'azote liquide puis ont été broyés. L'ARN total a été extrait de 100 mg de poudre congelée de feuilles et de racines à l'aide du kit RNeasy® Plant Mini (Qiagen, Hilden, Germany) selon les instructions du fabricant. La qualité et la quantité d'ARN ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre à microvolume mySPEC (VWR, Radnor, PA, USA). Pour chaque échantillon d'ARN, des bibliothèques d'ADNc ont été préparées pour le séquençage à partir d'ARN total en utilisant le kit Truseq Stranded mRNA (Illumina, San Diego, CA, USA) selon le protocole du fabricant. Les bibliothèques ont ensuite été séquencées sur Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) par la société GENEWIZ (<https://www.genewiz.com>, South Plainfield, USA) et les lectures ont été générées au format 150 bp pair-end.

### **2.10.2. Traitement des données RNAseq**

Le « nettoyage » des lectures de séquençage brutes a été effectué à l'aide du logiciel trimmomatic (Bolger et al., 2014) en supprimant les bases de faible qualité, les lectures vides



et les adaptateurs. Les gènes filtrés ont ensuite été alignés sur le génome de référence de *C. clementina* disponible sur <https://phytozome.jgi.doe.gov> (Wu et al. 2014) en utilisant MapSplice (Wang et al., 2010). Le comptage des lectures a été réalisé avec l'outil Python Htseq-count (Anders et al., 2015). Les valeurs d'expression ont été rapportées en tant que « Reads » par kilo base par million mapped reads (RPKM). Plus de 20000 gènes ont été retenus. Pour évaluer la qualité des données RNAseq filtrées et mettre en évidence les relations entre les échantillons, une analyse en composantes principales (ACP) et une analyse discriminante partielle des moindres carrés (PLSDA) ont été réalisées à l'aide du paquet R mixOmics (Rohart et al., 2017).

### **2.10.3. Analyse d'expression différentielle et catégorisation fonctionnelle**

Les gènes exprimés de manière différentielle (GED) ont été identifiés à l'aide du package R EdgeR (Robinson, McCarthy, et Smyth 2010) en utilisant le seuil suivant :  $\log_2FC \geq 2$  (FC, Fold Change) et des valeurs  $P < 0,05$  ajustées par la méthode de Benjamini et Hochberg (1995). La représentation de Venn et le niveau d'expression des gènes ont été réalisés sur le site web (<https://bioinfo-web.mpl.ird.fr/cgi-bin2/microarray/public/diffexdb.cgi>).

Tous les DEG ont été classés fonctionnellement par Gene Ontology (GO) en utilisant WEGO 2.0 (<http://wego.genomics.org.cn/>). La visualisation des catégories GO a été effectuée à l'aide du graphique d'annotation de l'ontologie génique du web en utilisant le logiciel WEGO 2.0 (Ye et al., 2006).

### **2.10.4. Analyse de réseaux de gènes**

Pour identifier les modèles de corrélation entre les gènes dans les échantillons de feuilles et de racines, une analyse de réseau de coexpression génétique pondérée (WGCNA) a été réalisée à l'aide du paquet R WGCNA (Langfelder & Horvath, 2008). Les gènes faiblement exprimés ont été supprimés avec un seuil minimum de 10 comptes. Avec les paramètres suivants pour l'échantillon de feuilles (Power = 9, minModuleSize=30, MEDissThres=0,20) et pour l'échantillon de racines (Power 6 ; minModuleSize=30 ; MEDissThres=0,10).

Des analyses de regroupement d'ontologies génétiques ont été réalisées sur le réseau de modules couplé à l'analyse Log2Fold from DEGs à l'aide du logiciel Biological Network Gene Ontology (BINGO), (version 3.9.0) (Maere et al., 2005) et d'un plug-in Cytoscape (V3.9.0 disponible sur [www.cytoscape.org](http://www.cytoscape.org)). Pour identifier les termes GO significativement enrichis ou surreprésentés, un test hypergéométrique et une correction des tests multiples ont été appliqués

en utilisant la correction du taux de fausse découverte de Benjamini et Hochberg avec un niveau de signification de 0,05.

### **2.11. Analyse hormonale de feuilles de limettiers Mexicain 2x, Tahiti 3x et sur racines de porte-greffes citrumelo 2x et 4x**

Le matériel végétal est le même que celui-ci utilisé dans le **2.10**. L'ensemble des hormones dosées a été fait par sous-traitance et réalisé par le plateau technique de Toulouse MetaToul – AgromiX, LRSV UMR 5546 UP/CNRS. Les hormones dosées dans les feuilles et les racines étaient les suivantes : ABA (acide abscissique), cis-ZR (cis zeatine-ribose), IPR (adenine-riboside), JA (acide jasmonique) et SA (acide salicylique).

***3. Chapitre 1 : Specific Physiological and Anatomical Traits Associated With Polyploidy and Better Detoxification Processes Contribute to Improved Huanglongbing Tolerance of the Persian Lime Compared With the Mexican Lime***

### 3.1. Résumé

Le premier chapitre de cette thèse a fait l'objet d'un article publié le 26 Août 2021 dans *Frontiers in Plant Science*.

L'étude faite dans ce papier a été axée principalement sur la canopée et donc sur les variétés (greffons) diploïdes (2x) et triploïdes (3x) et de leurs réponses face à la bactérie responsable du HLB. Les variétés choisies ont été le limettier Mexicain (2x) et le limettier Tahiti (Persian lime en anglais, 3x) et étaient toutes les deux greffées avec du Citrumelo Swingle 4475 2x afin d'étudier uniquement l'aspect variétal. Ce choix a été fait pour des raisons éco-agricoles par rapport aux partenaires. En effet, aux Antilles les limes, appelé « citron vert » de façon familiale, font partie des agrumes les plus cultivés par rapport à la demande des consommateurs (repas, jus, boissons alcoolisées, assaisonnements). De plus il a été montré que malgré la maladie, au champ, les variétés 3x semblaient mieux se comporter que les variétés 2x (Gómez et al., 2008).

Ainsi, pour pouvoir identifier les déterminants physiologiques et biomoléculaires associées à la meilleure tolérance à la maladie, différentes analyses moléculaires, microscopiques et biochimiques ont été faites.

Les analyses sanitaires par qPCR ont permis de montrer que les arbres infectés étaient bien malades et que les témoins étaient bien négatifs. De plus, au stade précoce de la maladie ; Las+ Asymptomatique (Las+ AS), une différence significative entre les variétés LM et LT a pu être observée. En effet, le nombre de copies de la bactérie était beaucoup plus élevé chez la variété 2x par rapport à la variété 3x, caractérisé par un Ct plus faible pour LM (*Table 1* ; (Sivager et al., 2021) suggérant déjà un niveau de tolérance moins élevé. Pour le stade tardif ; Las+ symptomatique (Las+ S), aucune différence significative n'a pu être observée. L'impact de la polyploïdie au niveau phénotypique est étudiée depuis des décennies (Ruiz et al., 2020) et a montré qu'elle pouvait avoir des conséquences notamment en augmentant la taille des cellules et des organes chez les agrumes (Allario et al., 2011; Corneillie et al., 2019; Mouhaya et al., 2010). Les résultats obtenus sur l'épaisseur et la taille des feuilles (*Table 2*) ont montré que ces caractères étaient plus importants chez les variétés 3x. De même, la taille des cellules stomatiques et épidermiques était significativement plus grande chez les feuilles de limettier Tahiti. Toutefois, la densité stomatique était diminuée chez les 3x par rapport au 2x (*Table 2*). Néanmoins ces résultats restaient tout de même en accord avec ceux obtenus sur d'autres

polyploïdes mettant en relation l'augmentation des cellules foliaires mais une diminution de la densité stomatique (Allario et al., 2011; Lourkisti et al., 2020; Padoan et al., 2013). La forte couleur verte retrouvée chez les feuilles a montré également une différence significative entre les deux variétés même si cette valeur avait tendance à diminuer avec les différents stades de la maladie. Cependant, le niveau de verdure restait toujours plus important chez la variété 3x. Ces résultats étaient en corrélation après les analyses de photosynthèse (*Figure 1*) où l'activité photosynthétique était toujours plus élevée chez les 3x par rapport aux 2x peu importe le stade de la maladie. Cette meilleure activité photosynthétique chez les limettiers 3x a déjà pu être montrée dans l'étude de Lourkisti et al., (2020) où les variétés hybrides 3x présentaient une photosynthèse plus efficace que les variétés hybrides de clémentinier 2x. A ces valeurs de l'activité photosynthétique, ont été couplées des mesures de conductance stomatiques et de transpiration qui étaient nettement supérieures chez les 3x (*Figure 1*). Ces fonctions photosynthétiques et respiratoires plus élevées peuvent donc expliquer la plus grande vigueur observée chez le limettier Tahiti 3x ce qui pourrait être favorable sous la contrainte du HLB (Deng et al., 2019).

La synthèse de callose est une des premières réponses de la plante face à la maladie (Achor et al., 2020; Koh et al., 2012). De ce fait, des études de microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées afin de visualiser le dépôt de callose au niveau des pores des cellules cribles du phloème et de noter l'éventuelle différence entre les deux variétés (*Figure 2*). Dans un premier temps, en condition contrôle (Las-) il a été possible d'observer une taille des pores des cellules cribles du phloème beaucoup plus grande au sein des pétioles de la variété 3x (*Figure 2, Table 4*) liée à un effet de la polyploïdie. De plus, aucune présence de callose ne pouvait être observée car les plants n'étaient pas infectés par la bactérie. En revanche pour les pétioles issus de feuilles symptomatiques (stade foliaire tardif; présence de marbrures asymétriques), aucune différence significative ne pouvait être observée car les deux variétés présentaient un fort dépôt de callose au niveau des cribles du phloème; résultats qui avaient déjà été obtenus dans différentes études (Achor et al., 2010; Albrigo et al., 2014; Koh et al., 2012) suggérant ainsi une altération du métabolisme chez les deux variétés. Des travaux récents réalisés par Deng et al., (2019) ont montré que la tolérance à l'HLB du citron « Bearss » et de la mandarine « LB8-9 » Sugar Belle® est associée à une régénération plus efficace du phloème, limitant la distorsion de la paroi cellulaire et l'effondrement des éléments criblés. Leur conclusion est en accord avec les augmentations du diamètre du pétiole, du phloème et de la surface du cortex du pétiole que nous avons observé chez le limettier Tahiti mais pas chez le

limettier Mexicain. Ceci laisserait donc supposer que le LT a connu une meilleure régénération du phloème que le LM, limitant la dégradation et l'effondrement du phloème. Enfin, au stade précoce de la maladie (Las+ AS), une différence notable entre les deux variétés pouvait être observée. La présence de callose au sein des pores des cellules cribles du phloème du LM était beaucoup plus importante par rapport à la variété 3x. Ce bouchage des pores de façon aussi précoce chez le LM était associé à une forte accumulation de grain d'amidon (*Figure 2C ; Table 3*) impliquant le fort impact du HLB comme cela avait pu être déjà démontré (Etxeberria et al., 2009; Schneider, 1968). Dans les feuilles du LM, la concentration en amidon était cinq fois plus élevée que celle des feuilles de LT. La plus grande taille des pores et le moindre bouchage des pores par la callose chez le limettier Tahiti permettrait alors de maintenir le flux de sève élaborée et continuer l'alimentation de la plante. Les résultats obtenus par MEB étaient en corrélation avec la visualisation de la callose après coloration au bleu d'aniline (*Figure 3*).

Le HLB conduit à un stress oxydatif et il a été montré que ce stress pouvait être lié à la chute des fruits matures infectés par la maladie (Tang & Vashisth, 2020). Dans le cas de notre étude, la concentration de MDA (*Table 4*), marqueur de stress qui correspond à la peroxydation des lipides (Luna et al., 2000; Tabassum et al., 2017), était deux fois plus élevée chez les feuilles 2x Las+AS que dans les feuilles 2x Las-. Aucun changement n'était observé dans les mêmes conditions pour les feuilles 3x, ce qui suggérait que le HLB engendrait un stress oxydatif beaucoup plus important et beaucoup plus tôt chez la variété 2x que chez la variété 3x. Tout ceci était en corrélation avec les analyses précédentes de microscopie (*Figure 2 et 3*) ou encore de photosynthèse (*Figure 1*). Les travaux de Lourkisti et al., (2020) et Oustric et al., (2017) sur les agrumes soumis à des températures basses, ou encore ceux ayant subi un déficit hydrique (Lourkisti et al., 2021) ou encore un stress salin (Khalid et al., 2020) montraient tous une valeur de MDA moins importante chez les polyploïdes indiquant ainsi un stress moindre chez les polyploïdes. De même, tout comme les résultats obtenus dans ces différents travaux sur les agrumes soumis à différents stress, le teneur des molécules (CAT, APX et AsA) qui permettent de limiter et d'éliminer l'excès de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) semblait plus important chez le LT que chez le LM, indiquant encore une meilleure adaptation du limettier Tahiti par rapport au limettier Mexicain face au HLB.

L'étude de Inoue et al., (2020) a montré qu'une concentration de fer ( $Fe^{2+}$ ) au niveau foliaire pouvait soulager les effets induits par le HLB. Dans notre étude, différents métaux ont été dosés dans les feuilles de limettiers 2x et 3x. La concentration de Fe observé chez le limettier Mexicain dès le stade précoce montrerait également un impact beaucoup plus important du

HLB chez cette variété par rapport à la 3x. Néanmoins, l'association entre le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le Fe<sup>2+</sup> peut donner naissance à une des espèces radicalaires hautement délétère : les radicaux hydroxyles (Inagaki et al., 2016; Migdal & Serres, 2011).

L'étude faite dans le **Chapitre 1** a permis de donner des informations sur la meilleure adaptation des 3x observée au champ par rapport aux diploïdes (Gómez et al., 2008). En effet, les traits anatomiques spécifiques du limettier Tahiti, comme une plus grande taille des feuilles ou encore des pores des cellules du phloème, liés à une meilleure activité photosynthétique et un bouchage partiel des pores au stade précoce de la maladie suggèreraient la meilleure tolérance de celle-ci. De plus, le dosage des molécules du système antioxydant ainsi que le dosage des métaux permettraient de valider l'hypothèse entre la polyplôidie et la meilleure tolérance au HLB.

### **3.1. Article**



# Specific Physiological and Anatomical Traits Associated With Polyploidy and Better Detoxification Processes Contribute to Improved Huanglongbing Tolerance of the Persian Lime Compared With the Mexican Lime

## OPEN ACCESS

Gary Sivager<sup>1</sup>, Leny Calvez<sup>1</sup>, Saturnin Bruyere<sup>1</sup>, Rosiane Boisne-Noc<sup>1</sup>, Pierre Brat<sup>2</sup>, Olivier Gros<sup>3</sup>, Patrick Ollitrault<sup>1</sup> and Raphaël Morillon<sup>1\*</sup>

**Edited by:**  
Jeremy Astier,  
INRA UMR 1347 Agroécologie,  
France

**Reviewed by:**  
Qibin Yu,  
University of Florida, United States  
Subhas Hajeri,  
Citrus Pest Detection Program,  
United States

**\*Correspondence:**  
Raphaël Morillon  
raphael.morillon@cirad.fr

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Plant Pathogen Interactions,  
a section of the journal  
Frontiers in Plant Science

**Received:** 25 March 2021

**Accepted:** 09 June 2021

**Published:** 26 August 2021

**Citation:**  
Sivager G, Calvez L, Bruyere S,  
Boisne-Noc R, Brat P, Gros O,  
Ollitrault P and Morillon R (2021)  
Specific Physiological and Anatomical  
Traits Associated With Polyploidy  
and Better Detoxification Processes  
Contribute to Improved  
Huanglongbing Tolerance of the  
Persian Lime Compared With  
the Mexican Lime.  
Front. Plant Sci. 12:685679.  
doi: 10.3389/fpls.2021.685679

<sup>1</sup> CIRAD, UMR AGAP Institut, Equipe SEAPAG, Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies—UMR AGAP Institut, Univ. Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France, <sup>2</sup> CIRAD UMR Qualisud Dpt PERSYST-Qualisud, Univ. Montpellier, Avignon Université, CIRAD, Institut Agro, IRD, Université de La Réunion, Montpellier, France, <sup>3</sup> C3MAG, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

Huanglongbing (HLB) is presently a major threat to the citrus industry. Because of this disease, millions of trees are currently dying worldwide. The putative causal agent is a motile bacteria belonging to *Candidatus Liberibacter* spp., which is transmitted by psyllids. The bacteria is responsible for the synthesis of callose at the phloem sieve plate, leading to the obstruction of the pores that provide connections between adjacent sieve elements, thus limiting the symplastic transport of the sugars and starches synthesized in leaves to the other plant organs. The Persian triploid lime (*Citrus latifolia*) is one of the most HLB-tolerant citrus varieties, but the determinants associated with the tolerance are still unknown. HLB-infected diploid Mexican lime (*Citrus aurantiifolia*) and Persian lime were investigated. The leaf petiole was analyzed using scanning electron microscopy (SEM) to observe callose deposition at the phloem sieve plate. Leaf starch contents and detoxification enzyme activities were investigated. In the field, Persian lime leaves present more limited symptoms due to HLB than the Mexican lime leaves do. Photosynthesis, stomatal conductance, and transpiration decreased compared with control plants, but values remained greater in the Persian than in the Mexican lime. Analysis of the petiole sieve plate in control petiole samples showed that pores were approximately 1.8-fold larger in the Persian than in the Mexican lime. SEM analyses of petiole samples of symptomatic leaves showed the important deposition of callose into pores of Mexican and Persian limes, whereas biochemical analyses revealed better detoxification in Persian limes than in Mexican limes. Moreover, SEM analyses of infected petiole samples of asymptomatic leaves showed much larger callose depositions into the Mexican lime pores than in the Persian lime pores, whereas biochemical traits



revealed much better behavior in Persian limes than in Mexican limes. Our results reveal that polyploids present specific behaviors associated with important physiological and biochemical determinants that may explain the better tolerance of the Persian lime against HLB compared with the Mexican lime.

**Keywords:** callose deposition, citrus, detoxification, huanglongbing, lime, triploid

## INTRODUCTION

Huanglongbing (HLB) is one of the most devastating citrus diseases worldwide and is caused by a phloem-restricted gram-negative  $\alpha$ -proteobacteria (*Candidatus Liberibacter* spp.; Bové, 2006). Three HLB-associated species were described in the taxonomy that were named according to their presumptive geographical origin: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) (Bové, 2006), *Candidatus Liberibacter africanus* (Jagoueix et al., 1994), and *Candidatus Liberibacter americanus* (Teixeira et al., 2005). In the Caribbean area, Las is the only strain that has been present since 2006 (Luis et al., 2009). The Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*), which efficiently spreads the disease, is the vector of Las. HLB affects tree development, fruit quality (Dala-Paula et al., 2019; Koh et al., 2020), and yields, which cause heavy economical loss (Tania Santivañez et al., 2013; Neupane and Moss, 2016) and can lead to tree death. A distinctive symptom of HLB is leaf yellowing with an asymmetrical pattern of blotchy yellowing or mottling of the leaf (Bové, 2006). Dieback of the canopy (Bové, 2006; Gottwald, 2010) follows the leaf symptoms. The disease causes relate to plant physiological perturbations that lead to increased callosis synthesis in phloem cells, which is responsible for plugging the sieve plate pores of the phloem cells (Achor et al., 2010; Koh et al., 2012; Albrigo and Stover, 2015), thus limiting symplastic transport between phloem cells. This callose deposition is often followed by phloem cell wall distortion, which may lead to sieve element collapse (Etxeberria and Narciso, 2015). Sugars and starch granules accumulate in the leaves (Schneider, 1968; Ed Etxeberria et al., 2009; Achor et al., 2010) because they can no longer be translocated to other organs. In the meantime, the starch and sugar contents in the symptom-presenting, HLB-infected leaves are much higher than in the controls (Achor et al., 2010; Fan et al., 2010). Such modifications of the leaf and root metabolisms (Bowman et al., 2016) have consequences, including deficiencies of microelements, such as zinc in the leaves and boron in the roots (Aubert, 2009). When infected, the tree is subjected to significant oxidative stress, leading to the induction of detoxification mechanisms that have crucial roles in disease adaptation (Martinelli et al., 2016).

It has long been considered that there is no genetic resistance to HLB in citrus. However, important variabilities of behavior under HLB constraints have been reported for the different species of the genus *Citrus* (Stover et al., 2014; Miles et al., 2017), which should be associated with better adaptation to the bacteria or differential attractiveness to the vector. For the related genera *Poncirus*, the lower susceptibility of trifoliolate orange could be related to a lower leaf appetence of *D. citri*, which, in turn, would limit the possibilities of infection and development of Las (Westbrook et al., 2011; Richardson and Hall, 2013). More recently, the evaluation of HLB symptoms in germplasm

collections under HLB constraints revealed complete resistance to HLB in related genera and particularly in Australian citrus species (Ramadugu et al., 2016; Alves et al., 2021). Several HLB-tolerant citrus hybrids and relatives were shown to synthesize antimicrobial peptides that can inhibit Las infections (Blaustein et al., 2018; Huang et al., 2021).

Within the genus *Citrus*, the triploid Persian lime (*Citrus x latifolia* Tan.) is one of the least susceptible to HLB (Gmitter et al., 2010; Evans et al., 2014). Recent work suggested that the tolerance of Persian lime is favored by a specific phloem regeneration mechanism that maintains the phloem sap flow (Deng et al., 2019). However, the phylogenetic origin and triploid level of this horticultural group should also be the major determinants of the better behavior under an HLB constraint. Persian lime results from the fusion between a diploid male gamete of *Citrus x aurantiifolia* (Christm.) Swing and a haploid female gamete of *Citrus x limon* L. (Burm; Ahmed et al., 2019, 2020). These two species are a result of interspecific hybridization between *Citrus medica* L. (citron) as the male parent and *C. x aurantium* L. and *Citrus medica x micrantha* Wester for *C. x lemon* and *C. x aurantiifolia*, respectively (Curk et al., 2016). Previous observations suggested that citron in the pedigree significantly correlated with HLB tolerance (Miles et al., 2017). As they both have a citron pedigree, the two varieties should have a greater tolerance to HLB. However, the Persian lime is the only genotype to present a greater tolerance to HLB compared to other cultivated genotypes (Evans et al., 2014).

Polyploidy is recognized as a major force driving plant evolution (Soltis and Soltis, 2009; Chen, 2010). Polyploidy is often associated with a wide range of morphological and physiological changes that may be advantageous under harsh environments (Brochmann et al., 2004). Indeed, several investigations have shown that polyploidization improves stress tolerance under adverse environmental conditions (for review, see Ruiz et al., 2020), which remains true in woody grafted plant species (Khalid et al., 2020; Ruiz et al., 2020). Most citrus are diploid, and several citrus species produce apomictic seeds favoring the natural occurrence of polyploidy among seedlings (Aleza et al., 2011). Interestingly, when subjected to varied stress, triploid (Lourkisti et al., 2020, 2021) and tetraploid citrus (Allario et al., 2013; Tan et al., 2015; De Souza et al., 2017; Oustric et al., 2017, 2019; Khalid et al., 2020) were more tolerant to oxidative stress because of more efficient oxidative systems. Recent observations suggest that some tetraploid rootstocks may limit the development of HLB (Grosser and Gmitter, 2011; Grosser et al., 2012). Reactive oxygen species (ROS) are free radicals and non-radical molecules, which are key components of the signaling pathway network and act as the main regulators of plant cell physiology and cellular responses to environmental factors (Bhattacharjee, 2012). Among them, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is an important, relatively

stable, non-radical ROS. At low concentrations,  $H_2O_2$  acts as a signal molecule involved in the regulation of specific biological and physiological processes (e.g., photosynthetic functions; cell cycle, growth, and development; and plant responses to biotic and abiotic stresses). Oxidative stress and eventual cell death in plants can be caused by excess  $H_2O_2$  accumulation. As stress factors provoke an enhanced production of  $H_2O_2$  in plants, severe damage can be induced at the cellular level. Plants are endowed with several  $H_2O_2$ -metabolizing enzymes and, primarily, with catalases (CAT) or ascorbate peroxidases (APX). CAT is a peroxisome-localized enzyme which do not require any reductant for catalyzing a dismutation reaction. APXs have a high affinity for  $H_2O_2$  and utilizes ascorbate (AsA) as a specific electron donor (Sofa et al., 2015).

In the present work, we compared the behavior under the HLB constraint and the control condition of the Mexican diploid lime (*C. x. aurantiifolia*) and the Persian triploid lime, which are known for their contrasted tolerance to HLB, respectively. We performed investigations in asymptomatic (Las+AS) and symptomatic (Las+S) leaves of infected trees compared to the control to understand the disease development process better. Control (Las-) and asymptomatic samples were collected on trees grown in distinct insect-proof greenhouses. Infection was obtained after grafting-infected budwoods to determine the precise moment of the infection. Thus, it was possible to limit the impact of other environmental factors. Symptomatic samples were collected on trees naturally infected by psyllids in the field because, in the greenhouse, we rarely acquire symptomatic leaves. The physiological leaf behavior was evaluated by measuring leaf gas exchanges. In this article, we performed anatomical measurements using scanning electron microscopy (SEM) and fluorescent microscopy, which were associated with the investigation quantification of antioxidant molecules enzymes involved in detoxification processes. Taken together, our findings provide new knowledge on the determinant of the phenotypic differentiation between Mexican limes and Persian limes, which highlighted the importance of ploidy for HLB disease tolerance within the genus *Citrus*.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Material and Growth Condition

The INRAE-CIRAD of San Giuliano in Corsica (France) provided diploid Citrumelo (SRA 928; *Citrus sinensis* [L.] Osbeck × *Poncirus trifoliata* [L.] Raf) seeds from the collection of the “CRB Citrus” biological resource center (Luro et al., 2017). Seedlings were planted in substrate and were kept in a greenhouse for 10 months. The ploidy status of 2× seedlings was checked and confirmed by flow cytometry (Partec I) according to Froelicher et al. (2007). Genetic conformity of the seedlings was confirmed by using SNPs markers developed by Bruyère et al. (2016).

Thirty genetically identical and uniform 2× seedlings were selected for further investigation. To compare the HLB tolerance of genotypes, controlling the development of the disease and transmitting the disease by grafting was necessary. Ten 10-month-old rootstock seedlings were grafted using budwoods collected near asymptomatic HLB leaves and control leaves of

the 2× Mexican lime [*C. aurantifolia* (Christm. Swingle, SRA 140)] and the 3× Persian lime [*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka, SRA 58]. The budwoods of asymptomatic HLB leaves were collected from a single tree initially infected in the greenhouse by using psyllids collected in the field. Budwoods of that tree tested molecularly positive for HLB. Inverted t-budding was performed 30 cm above the ground. Six control and infected trees of each genotype were grown in 40-L pots in close, but distinct, greenhouses for 18 months with day and night temperatures of 25–32°C and 22–28°C, respectively, and a relative humidity varying between 70 and 98%. These trees were used for the physiological, microscopic, and biochemical investigations.

Observations regarding the tree symptoms of HLB and a collection of symptomatic leaves (Las+S) were performed on the same 4-year-old rootstock and variety combinations planted in the field and naturally infected for 2 years.

### HLB Monitoring

DNA of *Candidatus Liberibacter asiaticus* was extracted from control leaves (Las-) and at different disease stages (Las+AS; Las+S) by using the Qiagen DNAeasy plant mini kit. The molecular detection of the bacteria was performed by using quantitative polymerase chain reaction (qPCR), according to Li et al. (2006), with the same primers and probes. Quantitative PCR were regularly performed (almost every 6 months) to characterize the infection status. After 18 months, all the trees presented a similar uniform size and were all positive for HLB.

### Leaf Physiological Parameters

The leaf thickness and area of each genotype were measured using a micrometer (IP65, Mitutoyo) and were scanned using Image J software.<sup>1</sup> Leaf greenness was measured using a SPAD meter (Minolta, SPAD-502, Japan). Leaf stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration ( $E$ ), and photosynthesis ( $A$ ) were periodically measured with LCpro + Portable Photosynthesis Systems (ADC BioScientific Ltd., Hoddeston, United Kingdom). The intrinsic photosystem II quantum yield (QY), which is the equivalent to  $(F_{m'} - F_0)/F_{m'}$ , was checked using a leaf fluorometer (Fluorpen FP 100, Photos System Instrument, Czechia). Measurements were performed within light-acclimated leaves; thus, QY corresponds to the QY of antennas but not to the whole photosystem (Genty et al., 1989). The light pulse was set at 3,000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (100%) to measure QY automatically according to the operation manual.

Each measurement ( $g_s$ ,  $E$ ,  $A$ , SPAD, and QY) was taken between 9 and 11 am on 9–12 mature leaves selected at medium plant height. Measurements were then done using a photosynthetic photon flux density (PPFD) maintained at 1,400  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Ten leaves of Mexican and Persian limes were used to measure their relative water contents (RWCs). Leaves were harvested in the morning at 9 am. The RWC (%) was determined as

$$W = 100 \times ([M_f - M_d] : [M_t - M_d]),$$

<sup>1</sup><http://rsbweb.nih.gov/ij/>

where  $M_f$  is the fresh mass;  $M_t$  is the turgid mass after leaf rehydrating; and  $M_d$  is the dry mass after drying the leaves in an oven. The leaf RWC takes into account the turgid mass of leaves. Thus, RWC corresponds to the proportion of the leaf water content related to the maximum water content contained in the leaf (Barrs and Weatherley, 1962).

Slides for the analyses of stomatal and epidermal cells and the number of stomata per unit of leaf surface area (stomatal density) were prepared by using the protocol developed by Morillon and Chrispeels (2001). Sixty stomata were measured from three different slide preparations that used three different mature leaves.

The starch content was estimated on leaves by using the method developed by Holm et al. (1986), with the absorbance measured at 510 nm.

### Petiole Preparation for SEM

Fresh cross sections of 2× (Mexican lime) and 3× (Persian lime) petioles were fixed overnight at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in a phosphate saline buffer (pH 7.2). The sections were then dehydrated in a series of acetone solutions for increasing concentration until reaching 100% acetone. Samples were then dried to a critical point in CO<sub>2</sub> and sputter-coated with gold before observation with a FEI Quanta 250 electron microscope at 20 kV. At least four independent preparations of three leaf petioles were used for each genotype for SEM analysis. These samples were also used for blue aniline staining preparations (see below). Some of the samples were also used for qPCR analysis (Table 1).

### Petiole Preparation for Blue Aniline Staining

Fresh cross sections of 2× and 3× petioles were fixed in formaldehyde overnight and then washed with a phosphate buffer (PBS, pH 7.2), followed by distilled water. The sections were dehydrated in a series of acetone solutions of increasing concentration and then incubated overnight in 100% acetone. The sections were analyzed after washing them quickly with phosphate buffer and staining for 10 min in an aqueous 0.1% blue aniline solution.

### Analysis of Stress Biomarkers and Detoxification System

All biochemical assays were performed by a Tecan Infinite 200 PRO machine and were done on control, asymptomatic, and

symptomatic leaves. To evaluate the presence of stress biomarkers in both limes, the presence of Malondialdehyde (MDA) was determined according to the method described by Léchaudel et al. (2013). The first absorbance reading was performed at 532 nm and the second at 600 nm. The method used for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content estimation was adapted from Velikova et al. (2000), and the absorbance was read at 350 nm. Enzymes of the detoxification system were also dosed. The CAT assay was adapted from Aebi (1984), and the activity was estimated by Aebi (1984) by measuring the reaction rate at 240 nm for 20 min. An APX assay was performed according to Nakano and Asada (1981), with the measured activity at 290 nm. A total ascorbate (AsA) assay was performed according to the method by Kampfenkel et al. (1995). The absorbance was read at 525 nm.

### Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the Petioles of Mexican and Persian Limes

For each sample, 330 g of petioles was ground in a 2-ml solution buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.1 M—pH 7.2). The ground samples were fixed in a final solution of 4% paraformaldehyde in the same buffer for 4 h at 4°C on silane-coated glasses placed in a wet chamber. Hybridization experiments were similar to those previously described by Brissac et al. (2011). Once the slides dried, the Cy3-marked target probe (Las406: 5'-CATTATCTTCTCCGGCG-3') used in Hilf et al. (2013) was added for an overnight hybridization in a 20% formamide solution. Slides were counterstained by SYBR Green and mounted with Cytomation fluorescent mounting medium (Dakocytomation®, France) before visualization under an epifluorescence microscope (Eclipse 80i Nikon®, France).

### Statistical Analysis

For each given date of the experiment, data were subjected to variance analyses using a one-way ANOVA (SigmaPlot version 11, from Systat Software, Inc., San Jose, CA, United States).<sup>2</sup> One-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test was used to assess significant differences. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ .

<sup>2</sup>www.systatsoftware.com

**TABLE 1** | Quantitative real-time PCR in the petioles of the control (Las-) as well as infected leaves that were asymptomatic (Las+AS) and symptomatic (Las+S) from Mexican and Persian limes, respectively.

	Las-		Las+AS		Las+S	
	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime
Ct	ND	ND	25.7 ± 0.4a	29.4 ± 0.4b	24.7 ± 0.2a	25.4 ± 0.7a

Results are expressed as mean + SE ( $n = 3$ ). For each given datum, different letters indicate a statistical difference between genotypes (one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test,  $P \leq 0.05$ ).

## RESULTS

In the field, Persian lime trees show higher growth compared with Mexican lime trees: 4 years after planting and 2 years after natural HLB infection, tree height is approximately 30% higher. Leaf yellowing and leaf mottling are quite uniform on most Mexican lime leaves. In Persian lime trees, leaf symptoms (Las+S) with asymmetric yellow mottling can be observed on some twigs, but other twigs present leaves without any apparent symptom (Las+AS). The impact of HLB on leaf phenology is also different. The number of leaves is higher in the Mexican lime, but the leaf maintenance on the Persian lime twigs seems to be much longer. This result correlates with the presence of numerous dead Mexican lime leaves at the bottom of the trees.

Control and infected trees grown in greenhouse conditions were tested by qPCR. As expected, controls were negative, and trees infected by HLB were positive (Table 1). Moreover, infected trees presented HLB symptoms. For Las+AS petiole leaves, the copy number of the bacterium quantified in Mexican lime trees was much higher than in Persian lime trees (Ct of 25.7 versus 29.4). In Las+S petiole leaves, the Ct values were similar for both genotypes (close to 25). These results are supported by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis using a probe targeted against Las on the same amount of grounded petiole material (Supplementary Figure 1). As expected, control samples did not present any fluorescence. However, the fluorescence in Mexican lime Las+AS was much higher than in Persian lime Las+AS (Supplementary Figures 1C,D). In Mexican and Persian lime Las+S petiole samples, the observed fluorescences were quite similar (Supplementary Figures 1E,F). Investigations were also performed at physiological, microscopic, and biochemical levels on the trees grown in greenhouse conditions. For control trees (Las-), the values of thickness, surface area, and RWC leaf values of Persian limes are significantly greater than those of the Mexican limes (Table 2). In addition, the stomatal size in the Mexican lime was smaller than in the Persian lime, which was the opposite of stomatal density, regardless of the plant's sanitary status. The epidermal cell area followed the same trend

as the stomata cell area. The leaf thickness values remained higher in Persian limes compared with Mexican limes. Finally, a decrease in SPAD, QY, and RWC values were observed in the Mexican Las+ leaves compared with the Las- leaves. Gas exchange measurements were performed on leaves of Las- trees (Figure 1A), as well as on Las+AS (Figure 1B) and Las+S (Figure 1C) leaves of infected trees. For leaves of Las- trees, an increase in light intensity during measurements led to an increase in the measured values of the stomata conductance (gs; Figure 1D), of the photosynthesis (A; Figure 1G) and transpiration (E; Figure 1J); these parameters were always higher in Persian lime leaves compared with Mexican lime leaves. In Las+AS and Las+S leaves, the value increases observed in control (Figures 1G,J) due to the increasing light intensity are much more limited than in Las+AS and Las+S (Figures 1H,I,K,L). However, they remained consistently higher in Persian limes compared with Mexican limes (Figures 1F,I,L). Similar observations were also true for SPAD and QY (Table 2).

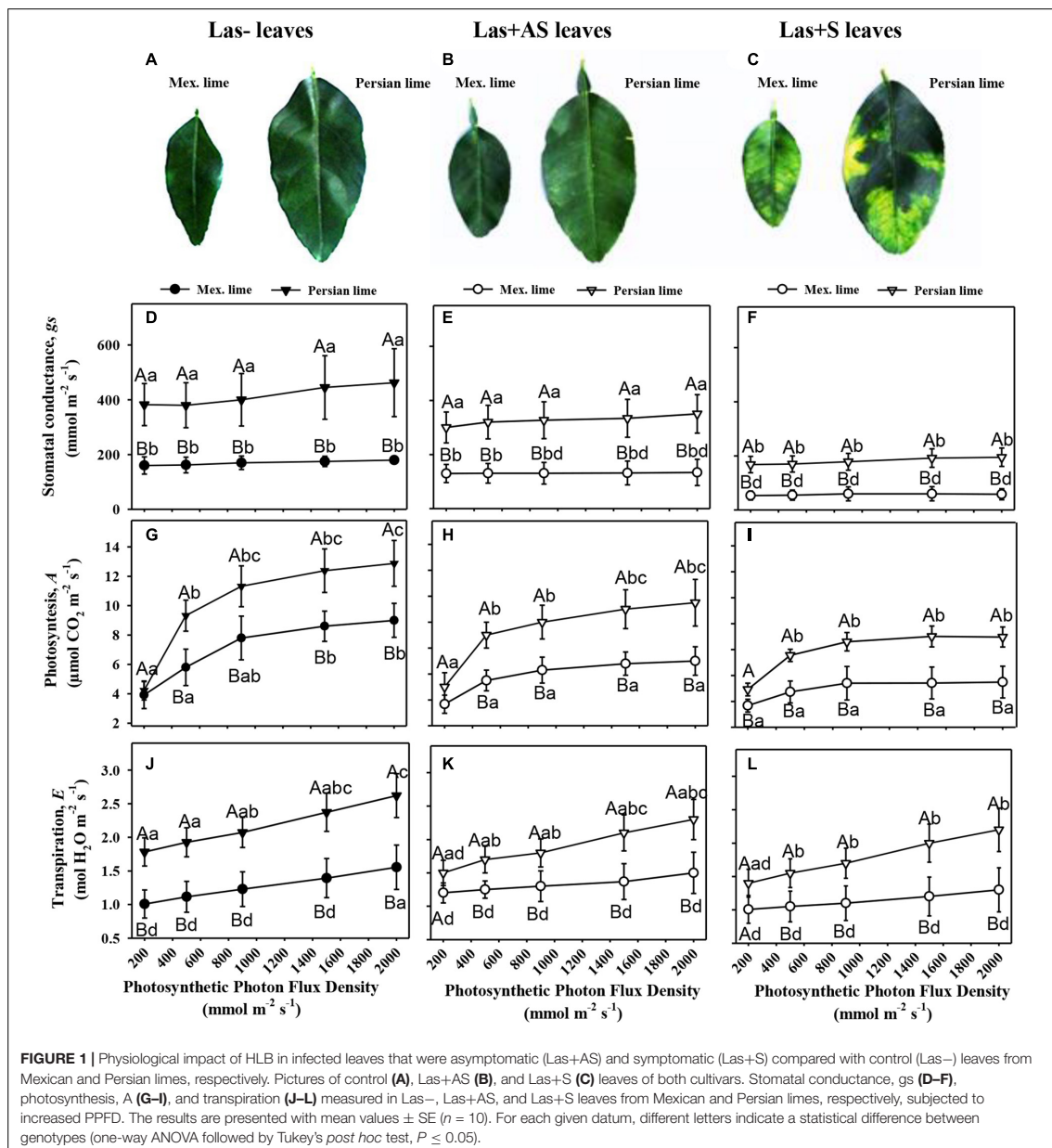
Measurements of starch content at the leaf level showed a higher amount in the Persian lime Las- leaves compared with the Mexican lime leaves (Table 3). In Las+AS leaves, a strong increase was found in the Mexican lime leaves compared with the control (about 10×), but it was only doubled in Persian lime leaves. For Las+S leaves, the starch content in Mexican limes and Persian limes are strong and not significantly different than for Las+AS Mexican limes (Table 3).

To decipher the impact of the disease in the phloem, SEM analyses were performed in the leaf petioles of the different genotypes. The petiole diameters and areas were greater in Persian limes than in Mexican limes (Table 4). In Las+ samples, the cortex, the phloem and xylem areas, and the pith area were also greater in Persian lime compared with Mexican lime. For the Las- leaves, Mexican limes presented phloem cells and pores between cells that were smaller than in Persian limes (Table 4 and Figures 2A,B). For Las+ leaf petiole samples, tissue and vessel collapses were observed. The pores in the petiole phloem cell walls of Las+AS Mexican lime leaves were no longer visible because they were clogged by callose deposits (Figure 2C).

TABLE 2 | Leaf physiological characterization of Mexican and Persian limes.

	Las-		Las+AS		Las+S	
	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime
Thickness (mm)	0.30 ± 0.06 a	0.41 ± 0.08 b	0.31 ± 0.07 a	0.45 ± 0.09 b	0.32 ± 0.05 a	0.54 ± 0.09 b
Leaf area (mm <sup>2</sup> )	1648 ± 340 a	3203 ± 695 b	1523 ± 280 a	3312 ± 825 b	1356 ± 312 a	3598 ± 1170 b
SPAD (AU)	57.2 ± 8.8 b	64.23 ± 8.61 b	55.2 ± 7.1 b	60.42 ± 8.6 b	41.5 ± 5.98 a	56.28 ± 11.94 ab
QY (AU)	0.61 ± 0.10 b	0.65 ± 0.07 b	0.62 ± 0.93 b	0.66 ± 0.12 b	0.36 ± 0.13 a	0.50 ± 0.13 ab
RWC (%)	80.4 ± 2.6 a	83.8 ± 0.7 b	79.2 ± 1.6 a	82.7 ± 2.6 b	76.2 ± 2.4 a	80.6 ± 3.2 a
Stomata area (μm <sup>2</sup> )	338 ± 7 a	360 ± 9 b	320 ± 12 a	370 ± 10 b	340 ± 13 a	366 ± 11 b
Stomata density/mm <sup>2</sup>	442 ± 7 b	381 ± 9 a	445 ± 6 b	390 ± 11 a	450 ± 10 b	401 ± 16 a
Epidermal cell area (μm <sup>2</sup> )	177 ± 5 b	210 ± 7 c	168 ± 4 b	221 ± 13 c	150 ± 8 a	230 ± 17 c

Leaf thickness, leaf area, leaf greenness (SPAD unit), effective quantum yield of PSII ( $\Phi$ PSII) within light-adapted leaves, relative water content (RWC), and leaf stomatal size and density, measured in the control (Las-) as well as infected leaves that were asymptomatic (Las+AS) and symptomatic (Las+S) from Mexican and Persian limes, respectively. Results are expressed as mean ± SE (n = 6–100 measurements). ANOVA tests were performed to determine if HLB led to significant differences. For each given datum, different letters indicate a statistical difference between genotypes (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test,  $P \leq 0.05$ ).



For Persian lime asymptomatic leaves, the pores were still not clogged, and no starch grain was present (Figure 2D). Interestingly, a large number of starch grains were visible in the petioles of Mexican lime Las+AS leaves (Figure 2C) but not in Persian lime leaves. For Mexican lime and Persian lime Las+S samples, pores were clearly plugged by callose deposits. Using the same type of samples, aniline blue staining was performed

to quantify the callose deposits. No deposits were observed for the controls (Figures 3A,B). On the other hand, a white ring was clearly visible at the phloem location for Las+AS Mexican lime samples, which was not the case for the Persian lime samples (Figures 3C,D). For the Mexican lime and Persian lime Las+S samples, a callose ring was present in both genotypes, but the ring was more intense for Mexican limes (Figure 3).



**TABLE 3** | Starch contents in the control (Las-) as well as infected leaves that were asymptomatic (Las+AS) and symptomatic (Las+S) from Mexican and Persian limes, respectively.

	Las-		Las+AS		Las+S	
	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime
Starch ( $\mu\text{g}^{-1}$ DM)	0.63 $\pm$ 0.01 a	1.30 $\pm$ 0.24 b	11.4 $\pm$ 0.03 d	2.13 $\pm$ 0.03 c	9.24 $\pm$ 0.10 d	10.85 $\pm$ 0.35 d

Results are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). ANOVA test was used to determine if HLB led to significant differences. For each given datum, different letters indicate a statistical difference between genotypes (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test,  $P \leq 0.05$ ).

Assays related to the quantification and the enzymatic activity of the main stress biomarkers and detoxification enzymes were performed by using leaf samples. A significant increase in MDA was observed in Las+AS Mexican lime leaves compared with the controls, but not in Persian lime leaves (Table 5). Increases in  $\text{H}_2\text{O}_2$  and AsA contents were observed for Mexican lime and Persian lime Las+AS samples compared with controls. However, CAT activity increased in Persian lime Las+AS leaves, but it did not increase in Mexican lime leaves. Interestingly, AsA content and CAT activity in control leaves were more than double in the Persian lime compared with the Mexican lime. For Las+S samples, an increase in MDA was observed in Persian limes but did not lead to a change in  $\text{H}_2\text{O}_2$  content compared with Las+AS (Table 5). AsA content decreased in Mexican lime and Persian lime Las+S samples compared with Las+AS samples. On the other hand, for APX, Las+S activity values were higher than for Las+AS for Mexican limes and Persian limes. For CAT, the activity values for Las+S Mexican lime remained stable compared with Las+AS, but the values decreased in Persian limes. Assays for copper (Cu), iron (Fe), and zinc (Zn) ion contents were also performed for the same type of leaf samples (Table 6). An increase in Cu content was observed in Mexican lime and Persian lime Las+S samples compared with controls. The increase is also significant regarding the Fe content in Mexican limes compared with the control and Las+AS and between Las+AS and Las+S. This same tendency was observed in Persian limes but to a lesser extent. Finally, decreases in Zn content were highlighted in Mexican lime and Persian lime Las+S samples compared with the Las+AS and control samples.

## DISCUSSION

### Anatomical and Physiological Differentiations Between Mexican Lime and Persian Lime Cultivars

Phenotypic differentiation associated with polyploidy has been extensively investigated (for review, see Ruiz et al., 2020). Ploidy in citrus leads to greater sizes cell and organ sizes, as observed for the leaf petiole diameters and the leaf surface areas of 4 $\times$  compared with Mexican limes (Table 4; Mouhaya et al., 2010; Allario et al., 2011). The Persian lime cultivar has higher leaf thickness values and larger stomatal and epidermal cell sizes than Mexican lime leaves do. Similarly, the stomatal density in the Persian lime is significantly lower than in the Mexican lime cultivar (Table 1). These results are in agreement with the results

obtained with other triploid and tetraploid plants, as polyploidy induces an increase in leaf thickness, an increase in size, and a decrease in stomatal cell density (Allario et al., 2011; Padoan et al., 2013; Lourkisti et al., 2020). Leaf greenness, intrinsic photosystem II QY, and gas exchange parameters have also shown different photosynthetic activities: Persian limes generally presented higher values of SPAD, QY,  $g_s$ ,  $A$ , and  $E$  than Mexican limes did. These higher photosynthetic and respiratory functions may explain the greater vigor observed in 3 $\times$  Persian limes that should be favorable under HLB constraint (Deng et al., 2019). In agreement with these results for Persian limes, Lourkisti et al. (2020) showed a higher photosynthetic efficiency in 3 $\times$  mandarin hybrids compared with 2 $\times$  clementine hybrids. Interestingly, the photosynthetic activities of tetraploid seedlings (Allario et al., 2011) and diploid sweet orange grafted on tetraploid rootstocks (Allario et al., 2013) were reduced compared to plants with diploid root systems, in association with higher constitutive ABA biosynthesis in tetraploid roots. It appears that polyploidy in roots and canopies have an antagonist effect on photosynthetic and respiratory function.

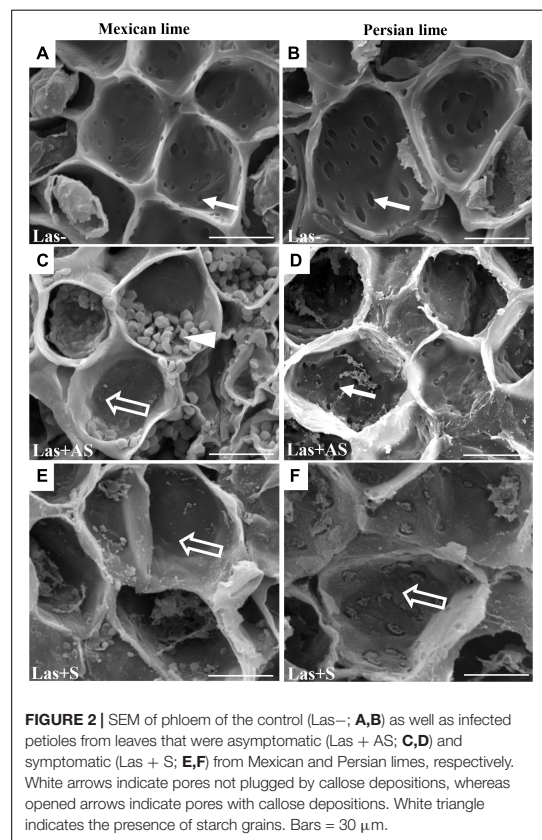
### Anatomical and Physiological Characterizations of Mexican and Persian Lime Cultivars Grown Under HLB Stress

Observations in the field showed that the Persian lime trees were much less affected than Mexican lime trees were, which fits with previous observations regarding HLB tolerance (Evans et al., 2014; Deng et al., 2019). Several cultivars, including lemons [(*C. limon* (*L.*) *Burm. F.*) and Persian lime] and the "LB8-9" Sugar Belle<sup>®</sup> mandarin hybrid ("Clementine" mandarin  $\times$  "Minneola" tangelo; Gmitter et al., 2010) have shown apparent HLB tolerance (Albrecht and Bowman, 2012; Ramadugu et al., 2016; Killiny et al., 2017; Miles et al., 2017; Wang et al., 2017). This tolerance was associated with the maintenance of vigorous growth and fruit yield. In greenhouse conditions, infected Mexican lime leaves were much more yellow than Persian lime leaves. These results are in agreement with the variation of gas exchange between control and infected trees measured in Persian limes and Mexican limes. Triploid Persian limes maintained the highest  $g_s$ ,  $A$ , and  $E$  values compared with Mexican limes. For infected trees, the values measured for Mexican limes were low, suggesting that the metabolism of this cultivar was extremely affected. Koh et al. (2012) showed that HLB leads to an increased callose synthesis in the phloem vessels, resulting in clogging of the pores at the sieve plate between cells (Achor et al., 2010).

**TABLE 4** | Anatomical characterization of leaf petioles of the control (Las-) as well as infected leaves that were asymptomatic (Las+AS) and symptomatic (Las+S) from Mexican and Persian limes, respectively.

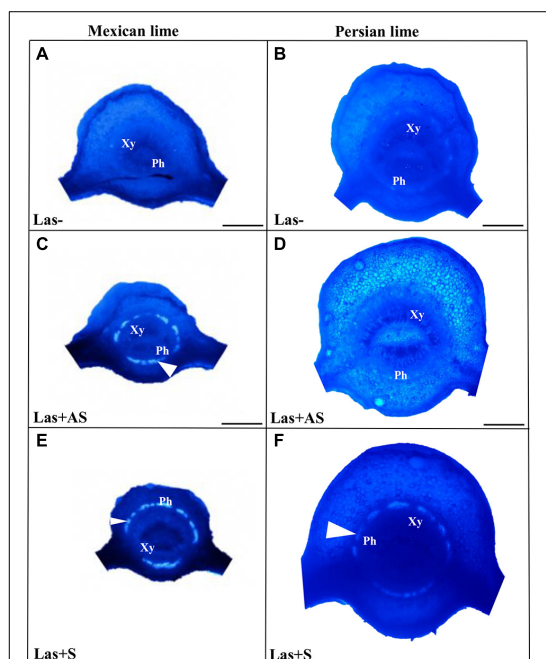
	Las-		Las+AS		Las+S	
	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime
Petiole diameter (mm)	1.28 ± 0.10 a	2.56 ± 0.35 b	1.31 ± 0.12 a	2.98 ± 0.41 b	1.23 ± 0.20 a	2.78 ± 0.40 b
Petiole area (μm <sup>2</sup> )	1327714 ± 48027 a	4579717 ± 2107471 b	1000764 ± 76969 a	4799763 ± 1131552 b	1369740 ± 51821 a	5113210 ± 670576 b
Cortex area (μm <sup>2</sup> )	1292947 ± 83 a	1518156 ± 603498 ab	979552 ± 438032 a	2042778 ± 815231 b	954458 ± 428548 a	2036659 ± 911788 b
Phloem area (μm <sup>2</sup> )	223991 ± 33838 a	572203 ± 143981 b	178772 ± 57310 a	485768 ± 73518 b	177072 ± 25140 a	614605 ± 144724 b
Phloem cells area (μm <sup>2</sup> )	1341 ± 435 a	2485 ± 995 b	1046 ± 385 a	2374 ± 1281 b	1362 ± 629 ab	2845 ± 1225 b
Pores of phloem cells area (μm <sup>2</sup> )	14.4 ± 1.5 a	26.5 ± 9.0 b	—	11.2 ± 0.8 a	—	—
Xylem area (μm <sup>2</sup> )	251721 ± 27948 a	675409 ± 143965 b	192375 ± 56087 a	598872 ± 46435 b	199294 ± 36780 a	694855 ± 79640 b
Pith area (μm <sup>2</sup> )	93962 ± 33240 ab	116838 ± 17589 ab	50032 ± 3254 a	133796 ± 40519 b	58734 ± 200692 a	156156 ± 53880 b

Results are expressed as the mean ± SE (n = 6–50). ANOVA tests were performed to determine if HLB led to significant differences. For each given datum, different letters indicate a statistical difference between genotypes (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, P ≤ 0.05).



**FIGURE 2** | SEM of phloem of the control (Las-; **A,B**) as well as infected petioles from leaves that were asymptomatic (Las + AS; **C,D**) and symptomatic (Las + S; **E,F**) from Mexican and Persian limes, respectively. White arrows indicate pores not plugged by callose depositions, whereas open arrows indicate pores with callose depositions. White triangle indicates the presence of starch grains. Bars = 30 μm.

To verify whether the differences between Mexican lime and Persian lime cultivars could be explained by different levels of intercellular sieve pore plugging, we performed SEM on petiole control samples. Phloem cells and sieve plate pores of Persian lime trees were larger than those of Mexican lime trees. This observation can be directly related to the ploidy levels of these two varieties. In HLB-infected petiole of symptomatic leaves, the phloem cell sieve pores were found to be heavily obstructed by callose deposition in the Mexican limes and Persian limes, as previously mentioned (Achor et al., 2010; Koh et al., 2012; Albrigo et al., 2014), indicating that the metabolisms of such leaves were strongly affected for both varieties. However, the phloem cell wall distortion and a sieve element collapse induced by the bacterium (Etzberria and Narciso, 2015) seemed to be more limited in Persian limes: In that genotype, the petiole diameter and the phloem petiole area were increased, while a strong decrease of these parameters was observed in Mexican lime. Recent work performed by Deng et al. (2019) showed that the HLB-tolerance traits of “Bearss” lemons and “LB8-9” Sugar Belle® mandarins are associated with more effective phloem regeneration, thus limiting the cell wall distortion and sieve element collapse. Their conclusion is in agreement with the increases in petiole



**FIGURE 3** | Aniline blue staining of the petioles of the control (Las–; **A,B**) as well as infected leaves that were asymptomatic (Las + AS; **C,D**) and symptomatic (Las + S; **E,F**) from Mexican and Persian limes, respectively. White triangles indicate the presence of callose deposition at the phloem location (Xy: xylem and Ph: Phloem). Bars = 0.5 mm.

diameter, phloem, and petiole cortex area observed in the Persian lime, suggesting that the Persian lime experienced a better phloem regeneration than the Mexican lime, limiting the phloem degradation and collapse. Interestingly, in Las+AS petioles of Persian limes, sieve pores remained open, and limited callose deposits were observed. Contrarily, the sieve pores remained plugged in infected (Las+AS and Las+S) Mexican limes. The higher callose depositions in Las+AS petioles of Mexican limes

compared to Persian limes, as observed by SEM, were confirmed by the presence of a strong white ring targeting the callose deposit when using aniline blue. The level of callose deposition is associated with a higher fluorescence labeling of Las in the Mexican lime and correlates with the lower Ct values measured in that genotype compared with the Persian lime, suggesting the faster development of the bacterium and a stronger impact at the physiological level. Starch accumulation is a classical symptom of a HLB-infected tree. A large number of starch grains were visible only in the Mexican lime, emphasizing the stronger impact of HLB in that genotype, as previously observed in different aerial organs (Schneider, 1968; Ed Etxeberria et al., 2009).

In Las– leaves of the Mexican lime compared with the Persian lime, a fivefold increase of the starch content (Table 3), a faster plugging of the pores between phloem cells (Figure 3C), and maintaining of lower values of gas exchange parameters (Figure 2) were noted. Taken together, this suggests that the larger cell and pore sizes in the Persian lime leaves and petioles, resulting from polyploidy, favored the longer maintenance period of the intercellular phloem flows in this variety (Figure 4). In turn, this reflects the specific phenology of the Persian lime, with a slower plugging of phloem cell pores and a better phloem regeneration (Deng et al., 2019), in agreement with a longer leaf lifetime of that genotype in comparison with the Mexican lime genotype.

### Differential Response to Oxidative Stress in the Mexican and Persian Limes

Mature fruit drop in HLB-infected citrus trees was shown to be related to oxidative stress genes coding for antioxidant enzymes, which were upregulated in HLB-susceptible citrus compared with tolerant citrus (Tang and Vashisth, 2020). MDA content is considered an indicator of oxidative stress as it corresponds to the final product of lipid peroxidation (Luna et al., 2000; Tabassum et al., 2017). A twofold increase in MDA content was observed in Mexican lime Las+AS leaves compared with the controls, whereas no significant change was observed in the Persian lime leaves at this disease development stage. The measured MDA concentrations suggested that Mexican limes were affected earlier by stress than the Persian limes were. In the Persian lime Las+AS leaves, the unchanged MDA

**TABLE 5** | Stress biomarkers (MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), antioxidant molecule (AsA) contents, and detoxification enzyme (APX, CAT) activities in the control (Las–) and infected leaves that were asymptomatic (Las+AS) and symptomatic (Las+S) from Mexican and Persian limes, respectively.

	Las–		Las+AS		Las+S	
	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime
<b>MDA (Arb. unit)</b>	1 ± 0.15 a	1.15 ± 0.32 a	2.44 ± 0.06 c	1.37 ± 0.50 ac	1.98 ± 0.06 c	3.74 ± 0.36 d
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Arb. unit)</b>	1 ± 0.03 a	0.96 ± 0.04 a	2.15 ± 0.08 c	2.04 ± 0.11 c	1.77 ± 0.15 b	2.08 ± 0.04 c
<b>AsA (Arb. unit)</b>	1 ± 0.31 a	2.34 ± 0.08 b	3.69 ± 1.59 b	7.85 ± 0.72 c	1.16 ± 0.20 a	2.60 ± 0.38 b
<b>APX (Arb. unit)</b>	1 ± 0.69 ab	0.08 ± 0.08 a	1.05 ± 0.38 ab	1.76 ± 0.82 b	4.08 ± 0.10 c	4.74 ± 0.05 c
<b>CAT (Arb. Unit)</b>	1 ± 0.6 a	2.9 ± 0.2 b	1.6 ± 0.4 a	15.0 ± 5.7 d	2.4 ± 0.9 b	4.8 ± 0.1 c

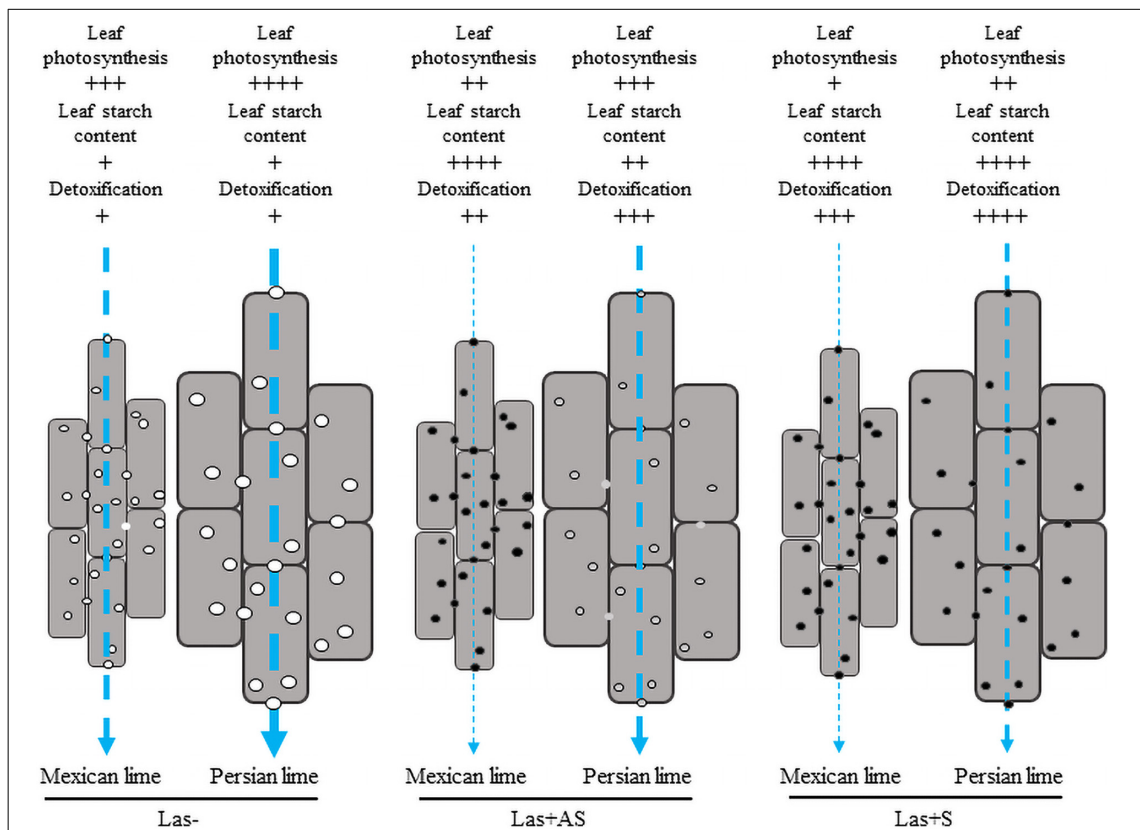
Values of Mexican lime prior infection were used as baseline to adjust the values of Las+AS and Las+S of Mexican lime and Persian lime. Results are expressed as mean ± SE (n = 4–6). ANOVA tests were performed to determine if HLB led to significant differences. For each given datum, different letters indicate a statistical difference between genotypes (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, P ≤ 0.05).



**TABLE 6** | Cu, Fe, and Zn contents in control (Las-) and infected leaves that were asymptomatic (Las+AS) and symptomatic (Las+S) from Mexican and Persian limes, respectively.

	Las-		Las+AS		Las+S	
	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime	Mexican lime	Persian lime
<b>Total Cu (mg/kg)</b>	3.85 ± 0.96 a	4.92 ± 1.23 ab	2.45 ± 0.61 a	6.82 ± 1.77 bc	5.18 ± 1.30 b	9.05 ± 1.36 c
<b>Total Fe (mg/kg)</b>	86.11 ± 4.31 b	71.17 ± 3.56 a	127.74 ± 6.39 d	84.06 ± 4.20 b	253.40 ± 2.53 e	107.47 ± 1.07 c
<b>Total Zn (mg/kg)</b>	21.24 ± 1.06 b	27.07 ± 1.35 c	20.30 ± 1.02 b	27.15 ± 1.36 c	10.51 ± 0.53 a	24.18 ± 1.21 c

Results are expressed as mean + SE (n = 4). ANOVA tests were performed to determine if HLB led to significant differences. For each given datum, different letters indicate a statistical difference between genotypes (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test,  $P \leq 0.05$ ).



**FIGURE 4** | Cellular model reflecting the impact of HLB at the leaf level with regard to phloemic sap flow in the petioles of the control (Las-) as well as infected leaves that were asymptomatic (Las+AS) and symptomatic (Las+S) from Mexican and Persian limes, respectively. Vertical arrows indicate the expected strength of the phloemic sap flow. In the control petiole, the pores and the cells are bigger, and the photosynthetic rate in the Persian lime is higher compared with the Mexican lime. Thus, the phloemic sap flux is expected to be higher in Persian lime than in the Mexican lime, which may favor the growth rate of the Persian lime. In Las+AS leaves, the photosynthetic rate and the detoxification are higher in the Persian lime than in the Mexican lime. The pores in the Mexican lime are clogged, which favors the accumulation of starch in leaf; however, pores are still open in the Persian lime, which helps with maintaining the flow of phloemic sap in that genotype. In Las+S leaves, the photosynthetic rate and the detoxification are still higher in the Persian lime than in the Mexican lime even though all pores are clogged. In both genotypes, a strong increase in the starch content is observed. One may expect, however, that for a given petiole length to cross, the larger size of the cells in the Persian lime corresponds to a more limited number of cell walls of the phloem to cross than in the Mexican lime. Associated with a greater photosynthetic rate, this will help in maintaining a higher phloemic sap flow in Persian lime Las+S than in Mexican lime Las+S.

content was consistent with a better HLB tolerance associated with more limited cellular oxidative damage. In triploid citrus subjected to natural chilling (Lourkisti et al., 2020) and to

water deficits (Lourkisti et al., 2021), as well as tetraploid citrus seedlings subjected to nutrient deficiency (Oustric et al., 2019) and salinity (Khalid et al., 2020), a lower MDA content was

consistent with more limited oxidative damage, suggesting an improved tolerance of polyploid citrus to oxidative stress. In Mexican lime Las+S leaves, a slight decrease in the MDA content was observed, whereas a threefold increase was observed in the Persian lime leaves, suggesting that the bacterium requested a longer amount of time to initiate oxidative stress in polyploidy. If H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents were similar in Mexican lime and Persian lime Las−, Las+AS, and Las+S samples, APX and particularly CAT activities were stronger in the Persian lime samples, which, in turn, favored the limitation of oxidative stress in the investigation of triploid citrus subjected to stress (Lourkisti et al., 2020, 2021). CAT, which can convert millions of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to water and oxygen per second, is undoubtedly the key marker differentiating the Persian lime from the Mexican lime in terms of ROS balance efficiency at the earlier disease stage. Indeed, the higher AsA content and the higher CAT activity in the Persian lime Las− leaf compared with the Mexican lime leaf, both of which have a similar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA content, would be in agreement with the better efficient antioxidant system in polyploid (Figure 4) as previously proposed by Allario et al. (2013).

Ascorbate peroxidases reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using AsA as the electron donor (Foyer and Noctor, 2005). AsA, with a more than twofold concentration in the Persian lime at the asymptomatic stage, can also act directly with ROS. An increase in Fe content was observed in Las+AS and Las+S leaf samples compared with the control. This increase was even stronger in the Mexican lime compared with the Persian lime (Table 6). HLB reduced foliar concentrations of calcium (Ca), magnesium (Mg), manganese (Mn), zinc (Zn), and iron (Fe) in infected leaves that were highly symptomatic, but HLB did not affect the root concentrations of these same essential nutrients (Hamido et al., 2019; Inoue et al., 2020).

Huanglongbing-polyploidy interactions are contrary to the well-known link between iron content and CAT activity (Lombardi et al., 2003). Indeed, the iron content in the Mexican lime is roughly tripled from Las− to Las+S and is associated with a strong CAT activity increase, but this is not true in the Persian lime. When HLB occurs in the Persian lime, even at the early stage (Las+AS), the CAT increases fivefold, whereas the iron content is close to that of the control.

The Fe and Cu increase that we observed in Las+AS and Las+S was probably transient and would cause the plant to limit HLB-induced stress through the translocation of these important micronutrients from the root to the leaf. Indeed, a foliar application of Fe<sup>2+</sup> was shown to relieve the symptom of HLB in citrus trees (Inoue et al., 2020). Also, the decrease observed in Zn contents from Las+ to Las+AS and Las+S may suggest that the Fe, Cu, and Zn decreases induced in strongly infected leaves do not happen at the same time. In association with iron (Fe<sup>2+</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can give rise to high deleterious radical species: hydroxyl radicals (Migdal and Serres, 2011; Inagaki et al., 2016). Indeed, the Fenton reaction induced by using Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> would favor the production of OH. Maintaining a relatively low level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> relates to the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through APX and its use in the Fenton reaction.

## CONCLUSION

In the field, the triploid Persian lime is one of the most HLB-tolerant cultivars. We have shown that this variety behaves better at a physiological and a biochemical level than its diploid Mexican lime parent does. Anatomical, physiological, and biochemical differentiations due to ploidy variation explain a large part of the behavior of the Persian lime under an HLB constraint. Using SEM analysis, we observed that the Persian lime's better tolerance to HLB was associated with the larger pore size in the sieve plate of the phloem cells of the leaf petiole compared with the Mexican lime. In addition, the investigation of infected petiole samples of asymptomatic leaves showed much larger callose depositions onto the Mexican lime versus the Persian lime, whereas symptomatic leaves showed important depositions onto Mexican lime and Persian lime pores. Our results provide insights into specific traits associated with polyploidy, such as the size of the pores of the phloem, as well as the Persian lime's detoxification processes, which can help maintain the phloemic flow in the plant and, thus, result in a better HLB-tolerance (Figure 4). Thus, investigations are required to decipher the molecular determinants of Persian lime cultivars' better HLB tolerance.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

GS, LC, SB, and RB-N performed the experiments and collected the physiological data. GS, PB, PO, and RM performed the statistical analyses, interpreted the results, and drafted the manuscript. GS and OG performed the analysis by SEM. LC and OG helped to draft the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

GS and LC were supported by the "Collectivité Territoriale de Martinique" and the "Région Guadeloupe." Investigations were supported by the "TROPICSAFE" Project funded by European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under Grant Agreement No. 727459 and the "CAVALBIO" Project funded by FEDER and the Guadeloupe Region (2015–2021).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.685679/full#supplementary-material>

**Supplementary Figure 1** | Fish analysis using a probe targeted against Las performed by using the same amount of grounded petiole material of the control (Las-; **A,B**) as well as infected leaves that were asymptomatic (Las + AS; **C,D**)

and symptomatic (Las + S; **E,F**) from the Mexican and Persian limes, respectively. White arrows indicate the florescence resulting from the presence of Las. Bars = 12  $\mu$ m.

## REFERENCES

- Ahmed, D., Comte, A., Curk, F., Costantino, G., Luro, F., Dereeper, A., et al. (2019). Genotyping by sequencing can reveal the complex mosaic genomes in gene pools resulting from reticulate evolution: a case study in diploid and polyploid citrus. *Ann. Bot.* 123, 1231–1251. doi: 10.1093/aob/mcz029
- Ahmed, D., Curk, F., Evrard, J. C., Froelicher, Y., Ollitrault, P., Almira, J., et al. (2020). Preferential disomic segregation and *C. micrantha/C. medica* interspecific recombination in tetraploid citrus. *Plant Pathol.* 69, 100–110. doi: 10.1093/pldis/ptaa009
- Alves, M. N., Lopes, S. A., Raiol-Junior, L. L., Wulff, N. A., Girardi, E. A., Ollitrault, P., et al. (2021). Resistance to 'Candidatus liberibacter asiaticus', the Huanglongbing associated bacterium, in sexually and/or graft-compatible citrus relatives. *Front. Plant Sci.* 11:2166. doi: 10.3389/fpls.2020.617664
- Achor, D. S., Etxeberria, E., Wang, N., Folimonova, S. Y., Chung, K. R., and Albrigo, L. G. (2010). Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathol. J.* 9, 56–64. doi: 10.3923/ppj.2010.56.64
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Albrecht, U., and Bowman, K. D. (2012). Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Sci.* 185–186, 118–130. doi: 10.1016/j.plantsci.2011.09.008
- Albrigo, L. G., Arítua, V., Wang, N., and Achor, D. (2014). Phloem disruption from HLB infection in canopy and root framework. *J. Citrus Pathol.* 1:299.
- Albrigo, L. G., and Stover, E. W. (2015). Effect of plant growth regulators and fungicides on Huanglongbing-related preharvest fruit drop of citrus. *HortTechnology* 25, 785–790. doi: 10.21273/horttech.25.6.785
- Aleza, P., Froelicher, Y., Schwarz, S., Agustí, M., Hernández, M., Juárez, J., et al. (2011). Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Ann. Bot.* 108, 37–50. doi: 10.1093/aob/mcr099
- Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, J. M., Iglesias, D. J., Pina, J. A., Navarro, L., et al. (2013). Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant. Cell Environ.* 36, 856–868. doi: 10.1111/pce.12021
- 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
- Aubert, B. (2009). *Huanglongbing (HLB) a Graft Transmissible Psyllid-Borne Citrus Disease: Diagnosis and Strategies for Control in Reunion Island - A Case Study (Translation From French of Excerpts From the Original 1988. Entitled: Le Greening une Maladie Infectieuse des Agrumes D'origine Bactérienne Transmise par des Homoptères Psyllidés Stratégies de Lutte Développées à l'île de la Réunion, Circonstances Épidémiologiques en Afrique Asie et Modalités D'intervention)*. Ph.D. thesis.
- Barrs, H., and Weatherley, P. (1962). A Re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 15:413. doi: 10.1071/bi9620413
- Bhattacharjee, S. (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. *J. Bot.* 2012, 1–22. doi: 10.1155/2012/985298
- Blaustein, R. A., Lorca, G. L., and Teplitski, M. (2018). Challenges for managing *Candidatus Liberibacter* spp. (Huanglongbing Disease Pathogen): current control measures and future directions. *Phytopathology* 108, 424–435. doi: 10.1094/phyto-07-17-0260-rvw
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88, 7–37.
- Bowman, K. D., McCollum, G., and Albrecht, U. (2016). Performance of "Valencia" orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) on 17 rootstocks in a trial severely affected by Huanglongbing. *Sci. Hortic.* 201, 355–361. doi: 10.1016/j.scienta.2016.01.019
- Brissac, T., Rodrigues, C. F., Gros, O., and Bastien Duperron, S. (2011). Characterization of bacterial symbioses in *Myrtea* sp. (*Bivalvia: Lucinidae*) and *Thyasira* sp. (*Bivalvia: Thyasiridae*) from a cold seep in the Eastern Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 32, 198–210. doi: 10.1111/j.1439-0485.2010.00413.x
- Brochmann, C., Brysting, A. K., Alsos, I. G., Borgen, L., Grundt, H. H., Scheen, A.-C., et al. (2004). Polyploidy in arctic plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 82, 521–536. doi: 10.1111/j.1095-8312.2004.00337.x
- Bruyère, S., François, L., Yann, F., Raphaël, M., and Patrick, O. (2016). "Poncirus phylogenetic diagnostic SNPs markers are useful to analyse zygotic rates in diploid and tetraploid Citrus x Poncirus rootstock seedlings," in *Abstract Book Sustainable Citriculture: The Role of Applied Knowledge*, eds D. Mattos, F. C. Eduardo, M. N. Valdenice, A. de Azevedo Fernando, D. C. F. Helvécio, and V. C. Z. Paulo (Londrina: IAC, IAPAR).
- Chen, Z. J. (2010). Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci.* 15, 57–71. doi: 10.1016/j.tplants.2009.12.003
- Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., and Ollitrault, P. (2016). Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Ann. Bot.* 117, 565–583. doi: 10.1093/aob/mcw005
- Dala-Paula, B. M., Plotto, A., Bai, J., Manthey, J. A., Baldwin, E. A., Ferrarezi, R. S., et al. (2019). Effect of Huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. *Front. Plant Sci.* 9:1976. doi: 10.3389/fpls.2018.01976
- De Souza, J. D., De Andrade Silva, E. M., Filho, M. A. C., Morillon, R., Bonatto, D., Micheli, F., et al. (2017). Different adaptation strategies of two citrus scion/rootstock combinations in response to drought stress. *PLoS One* 12:e0177993. doi: 10.1371/journal.pone.0177993
- Deng, H., Achor, D., Etxeberria, E., Yu, Q., Du, D., Stanton, D., et al. (2019). Phloem regeneration is a mechanism for Huanglongbing-tolerance of "bearss" lemon and "LB8-9" sugar bellepensispuspi® clespispuspi mandarin. *Front. Plant Sci.* 10:277. doi: 10.3389/fpls.2019.00277
- Ed Etxeberria, Narciso, C., Sood, P., Gonzalez, P., and Narcis, J. (2009). The anatomy of a laser label. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 122, 347–349.
- Etxeberria, E., and Narciso, C. (2015). Anatomy of the citrus leaf petiole: healthy vs. Huanglongbing. in *Acta Horticulturae* 1045, 891–898. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1065.110
- Evans, E. A., Ballen, F. H., and Crane, J. H. (2014). Economic potential of producing tahiti limes in southern Florida in the presence of citrus canker and citrus greening. *HortTechnology*, 24, 99–106. doi: 10.21273/HORTTECH.24.1.99
- Fan, J., Chen, C., Brlansky, R. H., Gmitter, F. G. Jr., and Li, Z.-G. (2010). Changes in carbohydrate metabolism in Citrus sinensis infected with 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. *Plant Pathol.* 59, 1037–1043. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02328.x
- Foyer, C. H., and Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866–1875. doi: 10.1105/tpc.105.033589
- Froelicher, Y., Bassene, J. B., Jedidi-Neji, E., Dambier, D., Morillon, R., Bernardini, G., et al. (2007). Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Rep.* 26, 937–944. doi: 10.1007/s00299-007-0314-y
- Genty, B., Briantais, J. M., and Baker, N. R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87–92. doi: 10.1016/S0304-4165(89)80016-9
- Gmitter, F. G. Jr., Castle, W. S., and Grosser, J. W. (2010). "Mandarin Tree Named 'LB8-9'." U.S. Patent Application No. 12/313,081.
- Gottwald, T. R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 119–139. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114418

- Grosser, J., Omar, A., Gmitter, J., and Syvertsen, J. P. (2012). Salinity tolerance of 'Valencia' orange trees on allotetraploid rootstocks. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 125, 50–55.
- Grosser, J. W., and Gmitter, F. G. (2011). Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 104, 343–357. doi: 10.1007/s11240-010-9823-4
- Hamido, S. A., Ebel, R. C., and Morgan, K. T. (2019). Interaction of Huanglongbing and foliar applications of copper on water relations of *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Plants* 8:298. doi: 10.3390/plants8090298
- Hilf, M. E., Sims, K. R., Folimonova, S. Y., and Achor, D. S. (2013). Visualization of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' cells in the vascular bundle of citrus seed coats with fluorescence in situ hybridization and transmission electron microscopy. *Phytopathology* 103, 545–554. doi: 10.1094/phyto-09-12-0226-r
- Holm, J., Björck, I., Drews, A., and Asp, N.-G. (1986). A rapid method for the analysis of starch. *Starch Stärke* 38, 224–226. doi: 10.1002/star.19860380704
- Huang, C. Y., Araujo, K., Sánchez, J. N., Kund, G., Trumble, J., Roper, C., et al. (2021). A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118:e2019628118. doi: 10.1073/pnas.2019628118
- Inagaki, Y., Cong, V. H., and Sakakibara, Y. (2016). Identification and application of Phyto-Fenton reactions. *Chemosphere* 144, 1443–1450. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.039
- Inoue, H., Yamashita-Muraki, S., Fujiwara, K., Honda, K., Ono, H., Nonaka, T., et al. (2020). Fe<sup>2+</sup> ions alleviate the symptom of citrus greening disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21:4033. doi: 10.3390/ijms21114033
- Jagoueix, S., Bove, J. M., and Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the  $\alpha$  subdivision of the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 379–386. doi: 10.1099/00207713-44-3-379
- Kampfenkel, K., Vanmontagu, M., and Inze, D. (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal. Biochem.* 225, 165–167. doi: 10.1006/ABIO.1995.1127
- Khalid, M. F., Hussain, S., Anjum, M. A., Ahmad, S., Ali, M. A., Ejaz, S., et al. (2020). Better salinity tolerance in tetraploid vs diploid Volkamer lemon seedlings is associated with robust antioxidant and osmotic adjustment mechanisms. *J. Plant Physiol.* 244:153071. doi: 10.1016/j.jplph.2019.153071
- Killiny, N., Valim, M. F., Jones, S. E., Omar, A. A., Hijaz, F., Gmitter, F. G., et al. (2017). Metabolically speaking: possible reasons behind the tolerance of 'Sugar Belle' mandarin hybrid to Huanglongbing. *Plant Physiol. Biochem.* 116, 36–47. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.05.001
- Koh, E. J., Zhou, L., Williams, D. S., Park, J., Ding, N., Duan, Y. P., et al. (2012). Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "Candidatus Liberibacter asiaticus". *Protoplasma* 249, 687–697. doi: 10.1007/s00709-011-0312-3
- Koh, J., Morales-Contreras, B. E., Guerra-Rosas, M. I., Osorio-Hernández, E., Culver, C. A., Morales-Castro, J., et al. (2020). Huanglongbing disease and quality of pectin and fruit juice extracted from Valencia oranges. *LWT* 131:109692. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109692
- Léchaudel, M., Lopez-Lauri, F., Vidal, V., Sallanon, H., and Joas, J. (2013). Response of the physiological parameters of mango fruit (transpiration, water relations and antioxidant system) to its light and temperature environment. *J. Plant Physiol.* 170, 567–576. doi: 10.1016/j.jplph.2012.11.009
- Li, W., Hartung, J. S., and Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *J. Microbiol. Methods* 66, 104–115. doi: 10.1016/j.mimet.2005.10.018
- Lombardi, L., Sebastiani, L., and Vitagliano, C. (2003). Physiological, biochemical, and molecular effects of in vitro induced iron deficiency in peach rootstock Mr.S 2/5. *J. Plant Nutr.* 26, 2149–2163. doi: 10.1081/PLN-120024271
- Lourkisti, R., Froelicher, Y., Herbet, S., Morillon, R., Giannettini, J., Berti, L., et al. (2021). Triploidy in citrus genotypes improves leaf gas exchange and antioxidant recovery from water deficit. *Front. Plant Sci.* 11:2311. doi: 10.3389/fpls.2020.615335
- Lourkisti, R., Froelicher, Y., Herbet, S., Morillon, R., Tomi, F., Gibernau, M., et al. (2020). Triploid citrus genotypes have a better tolerance to natural chilling conditions of photosynthetic capacities and specific leaf volatile organic compounds. *Front. Plant Sci.* 11:330. doi: 10.3389/fpls.2020.00330
- Luna, C., Garcia Seffino, L., Arias, C., and Taleisnik, E. (2000). Oxidative stress indicators as selection tools for salt tolerance in *Chloris gayana*. *Plant Breed.* 119, 341–345. doi: 10.1046/j.1439-0523.2000.00504.x
- Luis, M., Collazo, C., Llauger, R., Blanco, E., Peña, I., López, D., et al. (2009). Occurrence of citrus Huanglongbing in Cuba and association of the disease with *Candidatus liberibacter asiaticus*. *J. Plant Pathol.* 91, 709–712.
- Luro, F., Bloquel, E., Tomu, B., Costantino, G., Tur, I., Riolacci, S., et al. (2017). "The INRA-CIRAD citrus germplasm collection of San Giuliano, Corsica," in *AGRUMED: Archaeology and History of Citrus Fruit in the Mediterranean: Acclimatization, Diversifications, Uses [En Ligne]* (Naples: Centre Jean Bérard). doi: 10.4000/books.pcbj.2232
- Martinelli, F., Reagan, R. L., Dolan, D., Fileccia, V., and Dandekar, A. M. (2016). Proteomic analysis highlights the role of detoxification pathways in increased tolerance to Huanglongbing disease. *BMC Plant Biol.* 16:167. doi: 10.1186/s12870-016-0858-5
- Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med. Sci.* 27, 405–412. doi: 10.1051/medsci/2011274017
- Miles, G. P., Stover, E., Ramadugu, C., Keremane, M. L., and Lee, R. F. (2017). Apparent tolerance to Huanglongbing in Citrus and Citrus-related germplasm. *HortScience* 52, 31–39. doi: 10.21273/HORTSCI11374-16
- Morillon, R., and Chrispeels, M. J. (2001). The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14138–14143. doi: 10.1073/pnas.231471998
- Mouhaya, W., Allario, T., Brumos, J., Andrés, F., Froelicher, Y., Luro, F., et al. (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. doi: 10.1071/FP10035
- Nakano, Y., and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232
- Neupane, D., and Moss, C. B. (2016). "Estimating citrus production loss due to citrus Huanglongbing in Florida," *Proceedings of the 2016 Annual Meeting*, (San Antonio, TX: Southern Agricultural Economics Association) 6–9.
- Oustric, J., Morillon, R., Luro, F., Herbet, S., Lourkisti, R., Giannettini, J., et al. (2017). Tetraploid Carrizo citrange rootstock (*Citrus sinensis* Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) enhances natural chilling stress tolerance of common clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan). *J. Plant Physiol.* 214, 108–115. doi: 10.1016/j.jplph.2017.04.014
- Oustric, J., Quilichini, Y., Morillon, R., Herbet, S., Luro, F., Giannettini, J., et al. (2019). Tetraploid citrus seedlings subjected to long-term nutrient deficiency are less affected at the ultrastructural, physiological and biochemical levels than diploid ones. *Plant Physiol. Biochem.* 135, 372–384. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.12.020
- Padoan, D., Mossad, A., Chiancone, B., Germana, M. A., and Khan, P. S. S. V. (2013). Ploidy levels in Citrus clementine affects leaf morphology, stomatal density and water content. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 25, 283–290. doi: 10.1590/s2197-00252013000400006
- Ramadugu, C., Keremane, M. L., Halbert, S. E., Duan, Y. P., Roose, M. L., Stover, E., et al. (2016). Long-term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in Citrus relatives. *Plant Dis.* 100, 1858–1869. doi: 10.1094/PDIS-03-16-0271-RE
- Richardson, M. L., and Hall, D. G. (2013). Resistance of poncirus and citrus × poncirus germplasm to the Asian citrus psyllid. *Crop Sci.* 53, 183–188. doi: 10.2135/cropsci2012.02.0091
- Ruiz, M., Oustric, J., Santini, J., and Morillon, R. (2020). Synthetic polyploidy in grafted crops. *Front. Plant Sci.* 11:540894. doi: 10.3389/fpls.2020.540894
- Schneider, H. (1968). Anatomy of greening-diseased sweet orange shoots. *Phytopathology* 58, 1155–1160.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., and Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought

- and salinity stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 13561–13578. doi: 10.3390/ijms160613561
- Soltis, P. S., and Soltis, D. E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 561–588. doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.092039
- Stover, E., McCollum, G., Ramos, J., and Shatters, R. G. Jr. (2014). Growth, health and liberibacter asiaticus titer in. Diverse citrus scions on mandarin versus trifoliolate hybrid rootstocks in a field planting with severe Huanglongbing. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 127, 53–59.
- Tabassum, T., Farooq, M., Ahmad, R., Zohaib, A., and Wahid, A. (2017). Seed priming and transgenerational drought memory improves tolerance against salt stress in bread wheat. *Plant Physiol. Biochem.* 118, 362–369. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.07.007
- Tan, F. Q., Tu, H., Liang, W. J., Long, J. M., Wu, X. M., Zhang, H. Y., et al. (2015). Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement. *BMC Plant Biol.* 15:89. doi: 10.1186/s12870-015-0450-4
- Tang, L., and Vashisth, T. (2020). New insight in Huanglongbing-associated mature fruit drop in citrus and its link to oxidative stress. *Sci. Hortic.* 265:109246. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109246
- Tania Santivañez, C., Mora Aguilera, G., Díaz Padilla, G., López Arrollo, J. I., and Vernal-Hurtado, P. (2013). *Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe*. Roma: Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura.
- Teixeira, D. D. C., Danet, J. L., Eveillard, S., Martins, E. C., De Jesus, W. C., Yamamoto, P. T., et al. (2005). Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “Candidatus” Liberibacter species associated with the disease. *Mol. Cell. Probes* 19, 173–179. doi: 10.1016/j.mcp.2004.11.002
- Velikova, V., Yordanov, I., and Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Sci.* 151, 59–66. doi: 10.1016/S0168-9452(99)00197-1
- Wang, Z., Cheng, G., Han, X., Mu, X., Zhang, Y., Cui, D., et al. (2017). Application of single-molecule amplification and resequencing technology for broad surveillance of plasma mutations in patients with advanced lung adenocarcinoma. *J. Mol. Diagnostics* 19, 169–181. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.09.008
- Westbrook, C. J., Hall, D. G., Stover, E., Duan, Y. P., and Lee, R. F. (2011). Colonization of Citrus and Citrus-related germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *HortScience* 46, 997–1005. doi: 10.21273/hortsci.46.7.997
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher’s Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.
- Copyright © 2021 Sivager, Calvez, Bruyere, Boisne-Noc, Brat, Gros, Ollitrault and Morillon. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **3.2. Données complémentaires : analyses des composés de parois cellulaires de feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti**

### **3.2.1. La paroi végétale**

La paroi végétale est un composé rigide qui entoure les cellules végétales et se situe à l'extérieur de la membrane cellulaire. Elle apporte un soutien structural et est l'une des premières défenses contre les pathogènes (Staehelin, 2019). Elle est composée principalement de cellulose, hémicelluloses, pectines et glycoprotéines. Ces quatre fractions représentent respectivement, chez les dicotylédones, environ 30%, 30%, 35%, et 5% (Fry, 1988; Voragen et al., 2009). Afin de pouvoir être parfaitement efficace, ces différents composés s'organisent de la façon suivante : les microfibrilles de cellulose sont organisées pour former une matrice. L'hémicellulose est liée à la surface de la cellulose pour empêcher les microfibrilles de celle-ci de s'agglutiner. La pectine et les protéines sont intégrées dans le complexe cellulose/hémicellulose pour favoriser l'assemblage des composants. Enfin, avec la lignine, cela permet de fournir une résistance mécanique supplémentaire (Rao & Dixon, 2017).

Il existe deux types de parois cellulaires (Vogel, 2008) :

- Les parois de type I qui sont présentes chez dicotylédones, les monocotylédones non graminées et les gymnospermes
- Les parois cellulaires de type II qui, elles, sont présentes chez les graminées (Fincher, 2009).

#### **3.2.1.1. Les pectines**

Synthétisées dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi (Mohnen, 2008; Nebenführ & Staehelin, 2001), les pectines assurent plusieurs fonctions comme par exemple la formation des parois cellulaires ou encore l'induction de la lignification et de l'accumulation de protéases. Les pectines sont des hétéro-polysaccharides dont l'homogalacturonane est le polysaccharide peptidique le plus présent (~60 à 65%) (Rao & Dixon, 2017). Cet homopolymère est composé majoritairement de chaînes d'acide galacturonique liées en  $\alpha$ -(1,4) (**figure 17** ; Mohnen, 2008; Voragen et al., 2009). Les monomères les plus fréquemment retrouvés, en plus de l'acide galacturonique, sont l'arabinose, le galactose ou encore le xylose et le rhamnose.



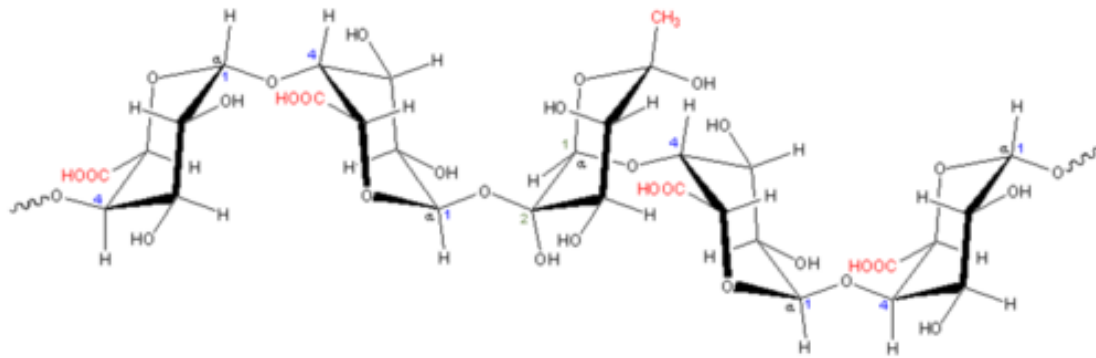


Figure 17 – Résidus de monomères d'acide galacturonique liés en  $\alpha$ -(1,4)

### 3.2.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses, polymères de sucres, représentent le deuxième composé le plus important dans la biomasse herbacée (Bajpai, 2018). Elles sont présentes dans presque toutes les parois cellulaires des plantes terrestres. Les hémicelluloses sont composées principalement de différents monomères de sucres comme le glucose, le mannose, le xylose, l'arabinose ou encore l'acide galacturonique (Bajpai, 2018; Li et al., 2013). Le ratio de ces monomères dépend de la nature de la plante étudiée. Ces polymères de sucres sont beaucoup plus solubles que la cellulose donc sont beaucoup plus sensibles à la dégradation chimique.

Une étude de (Corneillie et al., 2019) a indiqué que la polyploïdie serait à l'origine du grossissement de la taille des cellules chez les polyploïdes car celle-ci impacterait la composition des parois cellulaires. En effet, le développement des polyploïdes serait plus lent ce qui permettrait une augmentation cellulaire. Cependant le nombre de cellules serait moindre chez les polyploïdes par rapport à leurs homologues diploïdes. Ainsi une taille cellulaire plus grande chez les polyploïdes, notamment avec des pores du phloème plus grands, expliquerait certainement le plus faible impact de certaines maladies chez les polyploïdes. Nos résultats de microscopie électronique à balayage faites chez le limettier Tahiti montraient une plus grande taille des pores des cellules cribles du phloème et un faible dépôt de callose par rapport à celle du limettier Mexicain. De plus, les analyses biochimiques montrent une activation supérieure des systèmes de détoxification des ROS chez les 3x (*cf 3.1 du Chapitre 1*). Vu l'importance de la paroi végétale et des affaissements tissulaires observés au niveau du phloème chez la variété 2x, il m'a été proposé de faire un stage au laboratoire GlycoMEV à l'Université de Rouen pendant une période d'un mois et demi afin d'extraire les composés de parois cellulaires et de les analyser afin de vérifier si des dégradations des composés de parois spécifiques entre 2x et 3x pouvaient être mis en évidence.

### 3.2.2. Matériels et Méthodes

Dans le cadre de ma thèse, il a été convenu d'analyser les composés de ces parois cellulaires chez les feuilles de limettier Mexicain diploïde (2x) et de limettier Tahiti triploïde (3x) greffés avec du Citrumelo Swingle 4475 2x et vérifier si le HLB avait un impact sur ces composés. L'analyse a été faite sur des plants en condition témoin, infectés par le HLB mais qui ne présentaient pas de symptômes foliaires, et infectés présentant des symptômes foliaires. Le matériel utilisé à était le même que celui du **Chapitre 1**.

L'extraction de ces résidus insolubles dans l'alcool (AIR) a été faite selon la méthode décrite dans l'article de Plancot et al., (2019). Le travail d'analyse des composés de parois a été réalisé à l'Université de Rouen au laboratoire GlycoMEV par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID).

### 3.2.3. Résultats et analyses des composés de paroi cellulaires chez les feuilles de limettier Mexicain et Tahiti

#### 3.2.3.1. Analyse des fractions enrichies en pectines

En condition témoin, il est possible de remarquer qu'il n'y a aucune présence de glucose chez les 2x et les 3x ce qui signifie que l'élimination de l'amidon par traitement à l' $\alpha$ -amylase et l'amyloglucosidase a réussi. De plus, il est possible d'observer que les sucres qui sont présents chez les pectines sont bien présents chez les feuilles des 2x et 3x (Mohnen, 2008). En effet, les résultats ont montré en grande majorité l'acide galacturonique (GalA) puis l'arabinose (Ara), le galactose (Gal) et enfin le rhamnose (Rha). Néanmoins, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence pour GalA entre LTT et LTS ou encore pour l'arabinose entre LMT et le reste des échantillons (**figure 18**). Toutefois une différence notable a pu être mise en évidence pour le glucose (Glc) entre les échantillons témoins et asymptomatiques comparés aux échantillons symptomatiques. De plus, cette différence peut être observée également entre les échantillons 2x et 3x symptomatiques. Lors de la méthode d'extraction des différents composés l'amidon a été éliminé, il serait alors intéressant de savoir quel type de glucose se retrouve au niveau des échantillons symptomatiques.



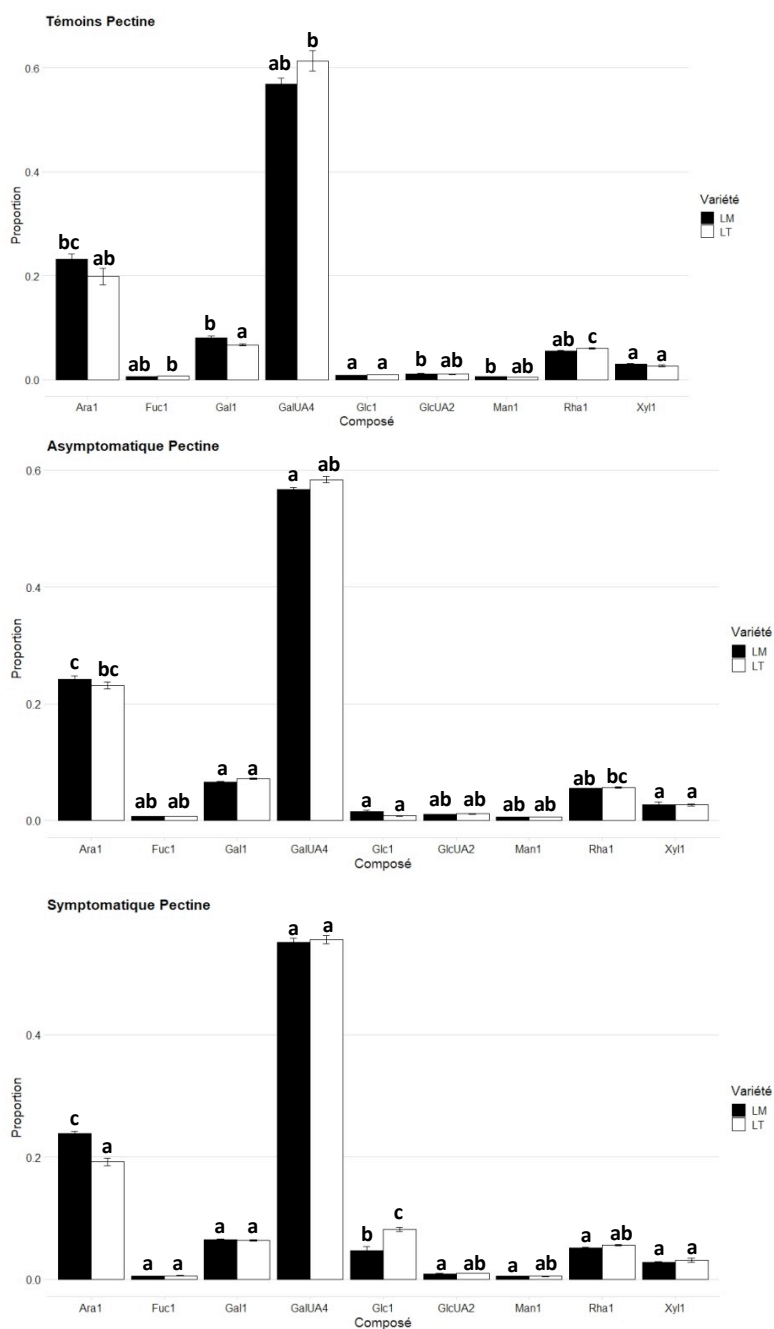


Figure 18 – Impact du HLB sur la composition en monosaccharides des fractions enrichies en pectines dans les feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti. Les proportions en monosaccharides ont été obtenues par analyse GC-FID. Les barres noires représentent la variété diploïde (limettier Mexicain 2x) et les blanches, la variété triploïde (limettier Tahiti 3x). Les moyennes des valeurs ont été obtenues avec trois réplifications biologiques et une réplification technique. Des tests ANOVA et Turkey ont permis d’indiquer s’il y avait une différence significative entre les variétés et une différence au cours de la maladie. La significativité est représentée par des lettres différentes.

### 3.2.3.2. Analyse des fractions enrichies en hémicelluloses

L’analyse des hémicelluloses dans les plants témoins a permis de mettre en évidence les différents composés présents dans celles-ci (**figure 19**). Le xylose (Xyl) était présent en majorité puis Ara, Gal, mais également Glc et GalA. Une diminution de la présence Xyl peut

être observée pour LT au cours de l'évolution de la maladie. A contrario, il y a une légère augmentation de Xyl pour LM sans toutefois que cette différence soit significative. Tout comme les pectines, les variations des sucres présents dans les hémicelluloses ne sont pas grandement et significativement différentes au cours de la maladie. Néanmoins, la proportion de Glc augmente également pour les échantillons LMS et LTS.

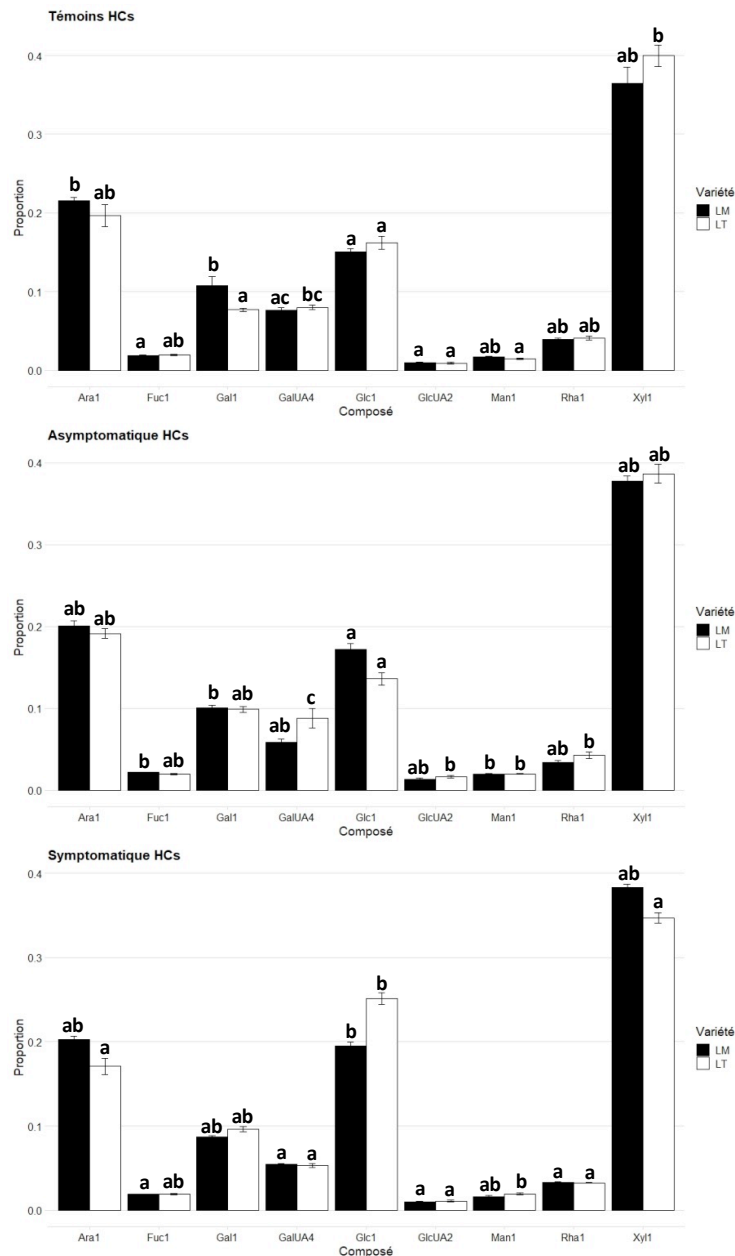


Figure 19 – Impact du HLB sur la composition en monosaccharides des fractions enrichies en hémicelluloses dans les feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti. Les proportions en monosaccharides ont été obtenues par analyse GC-FID. Les barres noires représentent la variété diploïde (limettier Mexicain 2x) et les blanches, la variété triploïde (limettier Tahiti 3x). Les moyennes des valeurs ont été obtenues avec trois répliques biologiques et une réplique technique. Des tests ANOVA et Turkey ont permis d'indiquer s'il y avait une différence significative entre les variétés et une différence au cours de la maladie. La significativité est représentée par des lettres différentes.

Les premières analyses des composés telles que les pectines et les hémicelluloses ne montrent pas de grandes différences entre les variétés 2x et 3x. Ces résultats ne seraient donc pas totalement en accord avec les résultats de Corneillie et al., (2019) qui indiquaient un impact de la ploïdie sur la composition des composés des parois cellulaires. Cependant, il est important de noter que les analyses de ces composés, faites par son équipe, ont été réalisées sur des plants 2x, 4x, 6x et 8x d'*Arabidopsis thaliana*, donc des lignées pures autoploïdes, ce qui diffère des analyses faites lors de notre étude qui, elle, a été faite sur des plants 2x et 3x. Il est important de noter que le limettier Tahiti est un allopolyploïde car il est issu d'un croisement entre le limettier Mexicain doublé (*Citrus aurantifolia* 4x) et d'un citronnier (*Citrus limon* 2x). Des études comme celles d'Adams et al., (2003) ont montré que les plants de cotons allotétraploïdes présentaient une forte hétérozygotie et donc pouvaient présenter une modification de leurs gènes d'environ 25%. À contrario, les autoploïdes avaient un effet limité sur la modification de leur génome quand on les compare à leurs diploïdes respectifs (Allario et al., 2011; Dai et al., 2015). De ce fait, le triploïde analysé présenterait une plus forte hétérozygotie par rapport aux polyploïdes de l'étude de Corneillie et al., (2019) et expliquerait certainement les faibles différences des proportions des sucres des parois cellulaires.

En ce qui concerne la maladie du HLB, une variation du taux de Glc était observable peu importe la fraction étudiée (pectine, hémicellulose). Suite à l'infection par la bactérie responsable du HLB, une forte synthèse de callose peut être observée au niveau des parois des cellules cribles du phloème (Koh et al., 2012). De ce fait, plus l'arbre est infecté, plus la présence de callose doit être importante. Il se pourrait donc que l'augmentation de glucose observée chez les échantillons LMS et LTS dans les différentes fractions provienne de la forte synthèse de callose induite par le HLB. Afin de vérifier cette hypothèse, l'utilisation d'anticorps anti-callose sur les différents échantillons permettrait de confirmer la présence de callose tout au long de la maladie. Dans un second temps, il sera intéressant de déterminer quels sont les différents types de sucres composant les différentes fractions d'hémicellulose et de pectines. En effet, dans le cas du mannose chez les hémicelluloses, ce dernier peut être sous forme de mannane, glucomannane ou encore galactomannane. De ce fait, faire une analyse immunologique slot-blot permettrait d'identifier le profil exact des sucres retrouvés dans les composés des parois cellulaires des feuilles du limettier Mexicain et du limettier Tahiti.

Après extraction des AIR, il a été possible de séparer les hémicelluloses en deux catégories : les hémicelluloses dites solubles (HCs) – présentées en **figure 19** – et les hémicelluloses dites insolubles (HCi). En effet, lors de l'étape de fractionnement, en neutralisant le pH à l'aide de l'acide acétique glacial, il a eu formation d'un précipité qui ne se solubilisait pas. Ces HCi ont donc également fait l'objet d'analyse par GC-FID.

Après analyse des HCi, bien que les résultats semblent indiquer une différence entre les échantillons témoins et symptomatiques (**figure 20**), ces résultats sont difficilement interprétables car de grands écart-types sont observables.

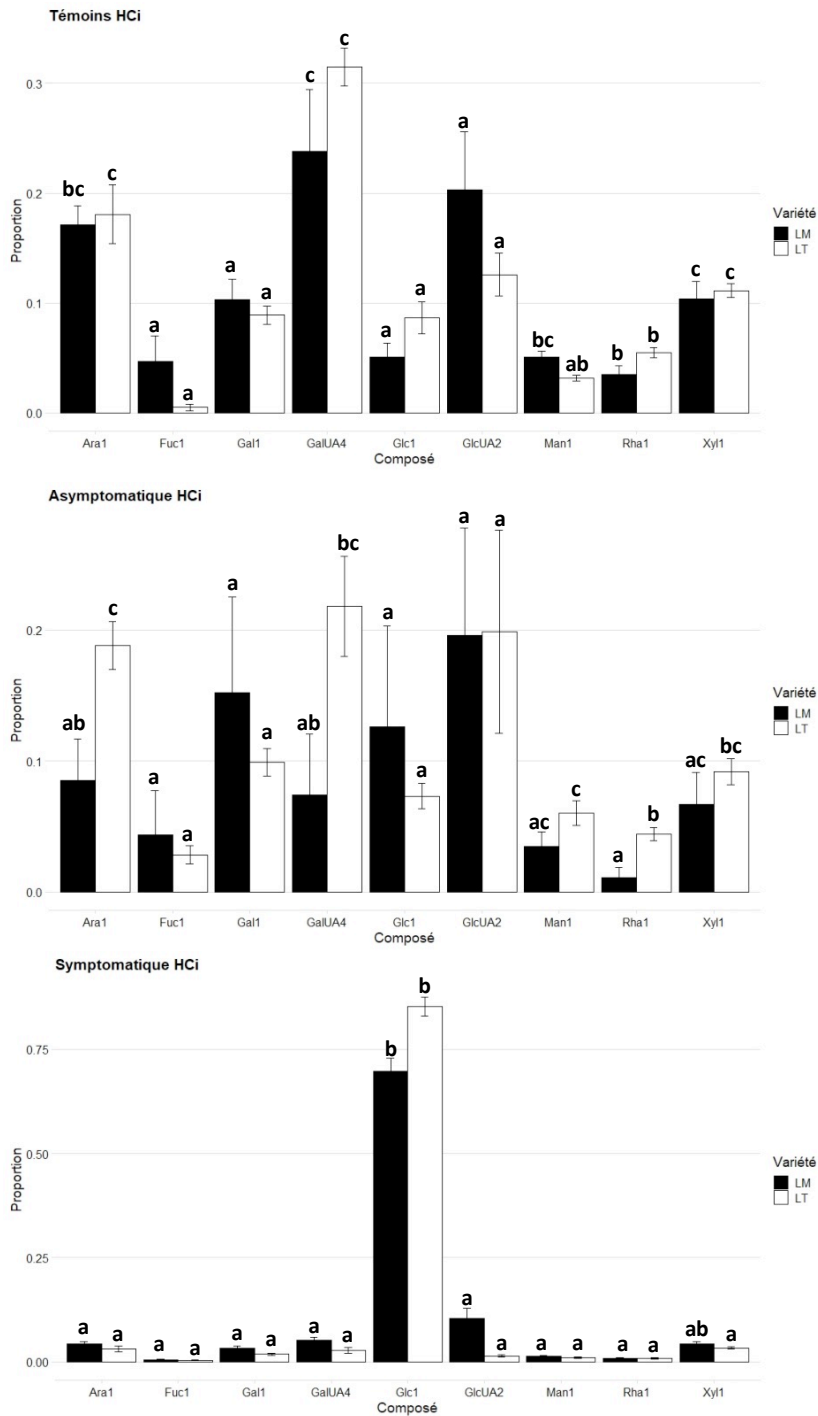


Figure 20 - Impact du HLB sur la composition en monosaccharides des fractions enrichies en hémicelluloses insolubles dans les feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti. Les proportions en monosaccharides ont été obtenues par analyse GC-FID. Les barres noires représentent la variété diploïde (limettier Mexicain 2x) et les blanches, la variété triploïde (limettier Tahiti 3x). Les moyennes des valeurs ont été obtenues avec trois réplifications biologiques et une réplification technique. Des tests ANOVA et Turkey ont permis d'indiquer s'il y avait une différence significative entre les variétés et une différence au cours de la maladie. La significativité est représentée par des lettres différentes.

Comme pour l'analyse des pectines et des hémicelluloses solubles, la plus grande différence notable, chez les différents composés, est celle du Glc. Malgré cette différence significative

pour le Glc, ces résultats ne seraient pas interprétables car une infime partie des composés présents dans les HCl a été analysée. En effet, le calcul des rendements a été effectué sur les différentes fractions (pectines, HCs et HCl) en utilisant la masse de départ et la masse de sucres analysés au total et les résultats (tableau 1) ont été les suivants :

Tableau 1 - Rendement total des monomères de sucres analysés par GC-FID chez les fractions de pectines, hémicelluloses solubles (HCs) et insolubles (HCl) présentes chez les feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti. Le rendement a été fait à partir de la masse totale initiale prise pour faire la GC-FID et la masse totale analysée après GC-FID pour chaque échantillon. Une moyenne de ces rendements a été faite afin d'obtenir le rendement total par variété chez les différentes fractions. Pour chaque fraction, LM et LT représentent la totalité des conditions (témoin, asymptomatique et symptomatique) et des répétitions prises en compte.

Rendement par variétés (%)	Pectines		HCs		HCl	
	LM	LT	LM	LT	LM	LT
	71,9	84,0	67,3	59,0	3,9	7,9

Le tableau ci-dessus, a permis de noter qu'au total seulement 10% des sucres présents chez les HCl ont été analysés. Ces rendements étant très faibles, par rapport à ceux des pectines et des HCs. Ces résultats suggèrent qu'il n'a pas été possible de rendre cette fraction d'hémicelluloses insolubles solubles lors des différentes étapes (bains dans le trifluoroacétique acide, dérivation...) précédant la GC-FID.

### 3.2.4. Conclusion

Les différentes analyses réalisées dans le laboratoire GlycoMEV à l'Université de Rouen n'ont pas permis de montrer une grande différence entre les parois cellulaires des deux variétés. En effet, aucune différence significative ne pouvait être réellement observée lors de l'analyse des différents composés de la paroi cellulaire chez les 2x et les 3x. Néanmoins, un point intéressant reste l'augmentation du glucose en condition symptomatique qui serait sûrement caractéristique d'une augmentation de callose due à la maladie du HLB.

Enfin, il a été montré qu'il y avait une perte racinaire malgré un enrichissement en amidon et autres hydrates de carbone (Kumar et al., 2018). Ainsi, même si aucune différence notable n'a pu être démontré du fait d'une plus forte hétérozygotie chez la variété 3x, il serait important de faire ces travaux d'analyse de composés de parois cellulaires au niveau du compartiment racinaire de porte-greffes 2x et 4x tels que le Citrumelo Swingle 4475 2x et 4x.

***4. Chapitre 2 : Better tolerance to Huanglongbing is conferred by tetraploid citrumelo rootstock and is influenced by the ploidy of the scion***

#### 4.1. Résumé

Le deuxième chapitre de cette thèse fait l'objet d'un article soumis à *Frontiers in Plant Science*.

L'étude faite dans cet article est axée principalement sur les racines de porte-greffes Citrumelo Swingle 4475 diploïde (2x) et tétraploïde (4x) et de leur réponse face au Huanglongbing. Ces différents porte-greffes étaient greffés avec du limettier Mexicain 2x et du limettier Tahiti 3x (Persian lime en anglais).

L'analyse phytosanitaire réalisés sur les feuilles de LM et LT a permis de montrer qu'il y avait bien une différence significative de la charge bactérienne, celle-ci étant plus importante pour la variété 2x par rapport au 3x peu importe que le porte-greffe associé soit 2x ou 4x (*Table 1*).

Des analyses macroscopiques et microscopiques ont été réalisées. Les photos macroscopiques des racines secondaires Las- (témoin) et Las+ (infecté) ont montré un brunissement de la couleur des racines dû à la maladie (*Figure 1*). Ces photos ont montré que les racines secondaires de citrumelo 4x sont plus épaisses que celles de citrumelo 2x avec des racines très fines en quantité plus limitées. L'infection a induit une dégradation des racines fines chez Cit 2x (*Fig. 1, E & G vs C & A*) alors que des changements limités ont été observés chez Cit 4x (*Fig. 1, F & H vs D & B*). Les analyses microscopiques par MEB ont montré que le diamètre et la surface des racines étaient plus importants dans le Cit 2x que dans le Cit 4x (*Tableau 2, Figure 2*). Dans les échantillons Las- et Las+, le cortex, la surface du phloème, la surface du xylème et le cylindre central étaient également plus grands dans le Cit 4x que dans le Cit 2x. En revanche, la microscopie n'a pas permis de visualiser un dépôt de callose au niveau des pores des cellules du phloème (supporté par les résultats de coloration au bleu d'aniline ; *Supp. Figure 1*). Ces résultats étaient donc en relation avec les travaux de Achor et al., (2020) suggérant que les pores du phloème des racines ne présentaient pas de callose, pouvant ainsi expliquer pourquoi les racines seraient un réservoir de la bactérie afin de se multiplier et de se développer dans le reste des plants (Johnson et al., 2013).

Différentes études ont montré l'impact de la polyploïdie dans la meilleure tolérance des porte-greffes face au stress oxydatif induit par différents stress abiotiques. Cependant, ces études étaient réalisées principalement sur les feuilles de ces porte-greffes (Khalid et al., 2020;



Oustric et al., 2019). Nos analyses ont porté sur la réponse des porte-greffes face au stress oxydatif induits par le HLB. Nous avons focalisé notre étude sur le compartiment racinaire dans le cadre d'une analyse électrochimique couplée à un dosage des polyphénols. Celle-ci a montré que pour le Cit2x associé au LT, il y a une forte diminution du signal dans les racines Las+ suggérant que les composants antioxydants oxydables à des potentiels élevés sont favorisés dans le Cit2x/LT par rapport à ceux du Cit2x/LM et que ces composants antioxydants sont très sensibles à l'infection. L'analyse des racines de porte-greffes 4x associés avec LM 2x, a montré une différence de signal par rapport au Cit2x associé à la LM. Ces résultats étaient en accord avec la meilleure tolérance du porte-greffe 4x par rapport au 2x.

L'analyse du dosage des polyphénols des racines de citrumelo 2x et 4x était très contrastée (*Figure 5*). Si dans les échantillons témoins, les teneurs étaient assez faibles, les racines 4x présentaient toujours des teneurs plus élevées que dans celles des 2x quelle que soit la ploïdie du scion. Ces résultats seraient en accord avec une préadaptation au stress en limitant le stress oxydatif comme proposé précédemment pour les géotypes polyploïdes (Allario et al., 2013). Il est intéressant de noter que l'infection par HLB a conduit à une augmentation de 10 fois le contenu en polyphénols dans les racines 4x par rapport à 2x. Puisque les polyphénols jouent un rôle crucial dans l'adaptation des plantes à l'environnement en raison de leur rôle dans la défense contre les stress biotiques (Cheynier et al., 2013) et abiotiques (Cheruiyot et al., 2007; Šamec et al., 2021; Tuladhar et al., 2021), qui est attribué à leur activité antioxydante (Martinelli et al., 2016), les polyphénols peuvent contribuer à la meilleure adaptation des polyploïdes face au HLB. Cette augmentation était encore plus forte lorsque les porte-greffes 4x étaient greffés avec le LT 3x, soulignant l'importance des interactions polyploïdes porte-greffes /scion comme moyen pour limiter le stress oxydatif induit par le HLB.

En se consacrant au compartiment racinaire, cette étude a permis de montrer l'impact de la polyploïdie face à la meilleure tolérance au HLB, rejoignant ainsi les résultats obtenus dans l'étude présenté dans le **Chapitre 1** (Sivager et al., 2021). Les différenciations anatomiques, physiologiques et biochimiques dues à la variation de ploïdie expliquent en grande partie le meilleur comportement des associations citrumelo 4x / 2x et 3x (*Figure 7*). En effet, si les pores des cellules racinaires du phloème 2x et 4x n'étaient pas bouchés par la callose dans les échantillons Las+, le stress oxydatif dans les racines 2x était beaucoup plus important et était associé à des teneurs plus faibles en polyphénols, ce qui peut à son tour expliquer la plus grande dégradation des racines observée dans les associations citrumelo 2x / 2x et 3x. Il est intéressant de noter que nos résultats démontrent que la ploïdie du scion a un impact important

sur la tolérance au HLB, qui est même améliorée lorsqu'il est associé à un porte-greffe 4x. Ainsi, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déchiffrer les déterminants moléculaires de la meilleure tolérance au HLB des porte-greffes et des scions polyploïdes ainsi que les interactions porte-greffes / scions polyploïdes.

## 4.2. Article



### **Better tolerance to Huanglongbing is conferred by tetraploid citrumelo rootstock and is influenced by the ploidy of the scion.**

#### **Authors' affiliations:**

Gary SIVAGER<sup>1</sup>, Leny CALVEZ<sup>1</sup>, Saturnin BRUYERE<sup>1</sup>, Rosiane BOISNE-NOC<sup>1</sup>, Barbara HUFNAGEL<sup>1</sup>, Gerardo CEBRIAN-TORREJON<sup>2</sup>, Antonio DOMÉNECH-CARBÓ<sup>3</sup>, Olivier GROS<sup>4,5</sup>, Patrick OLLITRAULT<sup>1</sup> and Raphaël MORILLON<sup>1</sup>

1-CIRAD, UMR AGAP Institut, Equipe SEAPAG, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies—UMR AGAP Institut, Univ. Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, F-34398 Montpellier, France.

2-COVACHIM-M2E Laboratory EA 3592, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles, BP 592 - 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, French West Indies.

3-Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de València, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

4-C3MAG, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles, BP 592 - 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, French West Indies.

5- Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité, Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, Université des Antilles. Campus de Fouillole, Pointe-à-Pitre, France

**Corresponding author:** Raphael Morillon, UMR AGAP Institut, Equipe SEAPAG, F-97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, French West Indies. E-mail: raphael.morillon@cirad.fr

**Number of Figures: 7 ; Number of Tables: 2**

**Number of Supplemental Figure: 3**

**Number of Supplemental Table : 1**

**ABSTRACT:**

Huanglongbing (HLB) is a disease which is responsible for the death of millions of trees worldwide. The bacterial causal agent belongs to *Candidatus Liberibacter* spp., which is transmitted by psyllids. The bacterium lead to a reaction of the tree associated with the synthesis of callose at the phloem sieve plate. Thus, the obstruction of pores providing connections between adjacent sieve elements will limit the symplastic transport of the sugars and starches synthesized through photosynthesis.

In a previous study, we identified several determinants associated with the better tolerance to HLB of the Persian triploid lime (*Citrus latifolia*) compared to diploid Mexican lime (*C. aurantiifolia*). In the present article, we investigated the impact of the use of tetraploid citrumelo rootstock on the tolerance to HLB compared to its respective diploid. HLB-infected diploid and tetraploid rootstocks were investigated when grafted with Mexican and Persian limes. Secondary roots were anatomically studied using Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) to observe callose deposition at the phloem sieve plate and evaluate the impact of the presence of the bacterium at cellular level. Voltammetry of immobilized microparticles (VIMP) in roots was applied to determine the oxidative stress status of root samples.

In the field, Mexican and Persian lime leaves of trees grafted onto tetraploid rootstock presented less symptoms of HLB. Anatomical analysis showed much stronger secondary root degradation in diploid compared to tetraploid. Analysis of the root sieve plate in control root samples showed that pores were approximately 1.8-fold larger in tetraploid citrumelo than in the its respective diploid. SEM analyses of root samples did not allow any observation of callose deposition into pores of diploid and tetraploid genotypes. VIMP revealed more limited oxidative stress in tetraploid samples compared to diploid. These results were even strongly enhanced when rootstocks were grafted with triploid Persian lime compared to Mexican lime, which was corroborated by stronger polyphenol contents. TEM analysis showed that the bacteria was present in both ploidy root samples with no major impacts detected on cell wall or cell structure. Our results reveal that tetraploid rootstocks confer better tolerance to HLB than diploid. Additionally, an even stronger tolerance is achieved when a triploid scion is associated.

**Keywords:** citrus, detoxification, huanglongbing, lime, polyploidy, rootstock.

## INTRODUCTION

Huanglongbing (HLB) is one of the most severe citrus diseases in the world and is caused by a phloem-restricted  $\alpha$ -proteobacteria (*Candidatus Liberibacter* spp.) (Bové, 2006). Three species of this gram-negative bacteria have been described in the taxonomy *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) (Bové, 2006), *Ca. L. africanus* (Jagoueix et al., 1994), and *Ca. L. americanus* (Teixeira et al., 2005). Vectors of these species are *Diaphorina citri* and *Trioza erytreae* spread the disease effectively. Economic losses are important (Santivañez et al., 2013; Neupane and Moss, 2016) since HLB lead to a production decrease due to impairments in tree development and fruit quality (Dala-Paula et al., 2019; Koh et al., 2020), and eventually tree- death. One of the most striking symptoms is observed on the leaves, which show asymmetrical yellow mottling on both sides of the midrib (Bové, 2006). The symptomatology of HLB is due to physiological disturbances related to the strong biosynthesis of callose at the phloem sieve plate, thus preventing the flow of elaborated sap (Achor et al., 2010; Koh et al., 2012). As a result, photosynthetic products such as starch accumulate in the leaves (Etxeberria et al., 2009; Achor et al., 2010). These foliar symptoms, although they are the most visible, would be rather late symptoms because they would develop from 6 months or more after those at the root level (Graham et al., 2013). While many studies focused in the implication of HLB in the canopy, the researches on the root system still limited. The study of Johnson et al., (2013) showed that the root system was a bacterial reservoir. Indeed, the bacterial quantity seemed more important at the root level than at the foliar level. Moreover, a relation between the decrease of the bacterial quantity in roots and the appearance of new flushes indicated that the roots were a place of multiplication and development for the bacteria in order to be able to colonize the rest of the plant. A recent study (Achor et al., 2020) demonstrated that, unlike the canopy, no callose deposition could be observed at the phloem sieve plate explaining why the roots would be the bacterial reservoir. Moreover, the presence of starch in the roots would not be limiting for the loss of the root system (Kumar et al., 2018), which would indicate that the bacteria has a direct action on the roots because the destruction of roots is still observed. Finally, HLB-infected plants show a strong oxidative stress inducing detoxification mechanisms in order to eliminate the reactive oxygen species (ROS) produced in excess (Martinelli et al., 2016). ROS, which are free radicals and non-radical molecules, are key components of the network of signaling pathways and act as major regulators of plant cell physiology and cellular responses to environmental factors (Bhattacharjee, 2012). Likewise, families of molecular compounds such as polyphenols are useful in the defense against environmental stress. It has been shown that these compounds also have antioxidant effects (Agati et al., 2012; Kumar and Pandey, 2013) in

order to reduce the cell toxicity of ROS. Therefore, following a stress, the concentration of phenolic compounds increases to fight against it (Sharma et al., 2019).

It has long been considered that there is no genetic resistance to HLB in genus *Citrus*. However, important variabilities of behavior under HLB constraints have been reported for the different species of the genus *Citrus* (Stover et al., 2015; Miles et al., 2017), which should be associated with better adaptation to the bacteria or differential attractiveness to the vector. For the related genera *Poncirus*, the lower susceptibility of trifoliate orange could be related to a lower leaf appetence of *Diaphorina citri*, which, in turn, would limit the possibilities of infection and development of Las (Westbrook et al., 2011; Richardson and Hall, 2013). More recently, the evaluation of HLB symptoms in germplasm collections under HLB constraints revealed complete resistance to HLB in related genera and particularly in Australian citrus species (Ramadugu et al., 2016; Alves et al., 2021). Several HLB-tolerant citrus hybrids and relatives were shown to synthesize antimicrobial peptides that can inhibit infections by Las (Blaustein et al., 2018; Huang et al., 2021).

Furthermore, studies have shown that polyploid plants are generally more tolerant to various biotic and abiotic stresses (for review, see Ruiz et al., 2020). The effectiveness of citrus tetraploid rootstocks has for example been shown against water deficit (Allario et al., 2013). In a recent work, we showed that triploid varieties, like Persian lime, have better anatomical and physiological properties than diploid species. They present a better antioxidant mechanism explaining why triploids behave much better on the field regarding the HLB disease (Sivager et al., 2021). Other studies suggested that some tetraploid rootstocks could limit the impact of HLB (Grosser and Gmitter, 2011; Grosser et al., 2012). However, there are no published studies analyzing specifically the impact of rootstocks polyploidy on the answer to HLB.

In this study, we compare the behavior of the rootstock Citrumelo Swingle 4475 diploid (2x) with its relative tetraploid (4x) form. The diploid Citrumelo Swingle 4475 resulted from a cross between a pomelo Duncan and *Poncirus trifoliata* and the tetraploid was selected in seedlings of 4475 Citrumello as a result of chromosome duplication in nucellar tissue (Aleza et al., 2011). Different analyses were done on rootstocks grafted with Mexican lime 2x and Persian lime 3x in control (Las-), from insect-proof greenhouses, and HLB (Las+) condition, after grafting-infected budwoods to determine the precise moment of the infection. Thus, it was possible to limit the impact of other environmental factors. Additionally, in order to visualize the different anatomical features in field conditions as well as possible callose deposit, we collected symptomatic samples on trees naturally infected by psyllids in the field. We performed

microscopic analysis, such as scanning electron microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis were performed to potentially quantify the bacteria in the 2x and 4x roots. Electrochemical analyses allowed us to detect changes in the composition of secondary metabolites by using in situ analysis of plant material performed in air-saturated solutions using conventional cyclic voltammetry. Finally, we identified polyphenols associated with an electrochemical activity in order to determine the antioxidant power of these two genotypes under HLB stress.

Altogether, our findings provide insights regarding the determinants associated to the better tolerance to HLB of 4x rootstocks. Furthermore, our results underline the strong interaction between rootstock and scion, influencing the tolerance to this disease.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Plant material and growth condition***

The INRAE-CIRAD of San Giuliano in Corsica (France) provided diploid and tetraploid Citrumelo (SRA 928; *Citrus sinensis* [L.] Osbeck × *Poncirus trifoliata* [L.] Raf) seeds from the collection of the “CRB Citrus” biological resource center (Luro et al., 2017). Seedlings were planted in substrate and were kept in a greenhouse for 10 months. The ploidy status of 2x and 4x seedlings was checked and confirmed by flow cytometry (Partec I) according to (Froelicher et al., 2007). Genetic conformity of the seedlings was confirmed by using SNPs markers developed by Bruyère et al., (2016).

Thirty genetically conform and uniform 2x and 4x seedlings were selected for further investigation. To compare the HLB tolerance of genotypes, controlling the development of the disease and transmitting the disease by grafting was necessary. Ten 10-month-old rootstock seedlings were grafted using budwoods collected near asymptomatic HLB leaves and control budwoods of the 2x Mexican lime (*Citrus aurantiifolia* [Christm. Swingle, SRA 140]) and the 3x Persian lime (*Citrus latifolia* [Yu. Tanaka] Tanaka, SRA 58) according to (Sivager et al., 2021). Six control and infected trees of each genotype were grown in 40-L pots in close, but distinct, insect-proof greenhouses for 18 months with day/night temperatures of 25–32 °C and 22–28 °C, respectively, and a relative humidity varying between 70 and 98%. The collect of symptomatic leaves (Las+S) was also performed on four years trees of the same rootstock and variety combinations naturally infected for two years. All these trees were used for the physiological, microscopic, and biochemical investigations.

### ***HLB monitoring***

HLB monitoring was performed according to (Sivager et al., 2021). Briefly, DNA was extracted from control leaves (Las–) and at different disease stages (Las+AS; Las+S) by using the Qiagen DNAeasy plant mini kit. The molecular detection of the bacteria was performed by using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Quantitative PCR were regularly performed (almost every 6 months) to characterize the infection status. After 18 months, all the trees presented a similar uniform size and were all positive for HLB.

### ***Roots preparation for ultrastructural analysis (SEM and TEM)***

Scanning electron microscopy (SEM). Fresh longitudinal sections of 2x and 4x (Citrumelo Swingle 4475) roots of plants grafted with 2x (Mexican lime) or 3x (Persian lime) limes were fixed overnight at 4 °C in 2.5% glutaraldehyde in a phosphate saline buffer (pH 7.2). The

sections were then dehydrated in a series of acetone solutions of increasing concentration until reaching 100% acetone. Samples were then dried to critical point in CO<sub>2</sub> and sputter-coated with gold before observation with a FEI Quanta 250 electron microscope at 20 kV.

Transmission electron microscopy (TEM).

Fresh longitudinal sections of roots were prefixed overnight at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in a phosphate saline buffer (PBS; pH 7.2) then for 1 hour under vacuum at RT. Samples were then rinsed twice in the same buffer for 10 minutes in order to remove aldehyde before fixation of 45 minutes at room temperature in 1% osmium tetroxide, in PBS. Then, samples were rinsed three times in distilled water for 5 minutes, and post-fixed with 2% aqueous uranyl acetate for one more hour. After three rinses in distilled water, specimens were dehydrated through a graded acetone series at room temperature before embedding in LR white resin under vacuum. Thin sections (80 nm thick) were observed in a Tecnai G20 TEM at 200 Kv or using STEM mode with a FEI Quanta 250 electron microscope at 20 kV.

#### ***Root preparation for blue aniline staining***

Fresh cross sections of 2x and 3x roots were fixed in formaldehyde overnight, then washed with a phosphate buffer (PBS, pH 7.2) followed by distilled water. The sections were dehydrated in a series of acetone solutions of increasing concentration and then incubated overnight in 100% acetone. The sections were analyzed after washing them quickly with phosphate buffer and staining for 10 min in an aqueous 0.1% blue aniline solution.

#### ***Fluorescence in situ hybridization (FISH) of Candidatus Liberibacter asiaticus in the roots of 2x and 4x Citrumelo Swingle 4475 grafted with Mexican or Persian limes.***

For each sample, 330 g of roots were ground in 2-ml solution buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.1 M – pH 7.2). The ground samples were fixed in a final solution of 4% paraformaldehyde in the same buffer for 4 hours at 4 °C on silane-coated glasses placed in a wet chamber. Hybridization experiments were similar to those previously described by Brissac et al. (2011). Once the slides dried, the Cy3-marked target probe (Las406: 5'-CATTATCTTCTCCGGCG-3') used in Hilf et al. (2013) was added for an overnight hybridization in a 20% formamide solution. Slides were counterstained by SYBR Green and mounted with Cytomation fluorescent mounting medium (Dakocytomation®, France) before visualization under an epifluorescence microscope, Eclipse 80i (Nikon®, France).



### ***Polyphenols contents***

Roots were fixed with liquid nitrogen and then they were ground. 500 mg of ground samples were incubated for 72h in 10 mL 100% methanol and then filtered. The polyphenolic assays were performed with “Folin Ciocalteu Phenolic Content Quantification Assay” kit according to the manufacturer’s instructions Bioquochem. A standard curve was done to determine the sample phenolic concentrations.

### ***Electrochemistry***

Electrochemistry was done according to the method of Palmeira-Mello et al., (2021) with a Bio-Logic SP-300 tool. Electrochemical experiments were performed at  $298\pm 1$  K in a conventional three-electrode cell using a platinum wire auxiliary electrode and an Ag/AgCl (3M NaCl) reference electrode. Measurements were carried out with a Bio-Logic SP-300 equipment using 0.10 M potassium phosphate buffer at pH 7.0 as a supporting electrolyte. The working electrode was prepared by evaporating 50  $\mu$ L of a methanol of ground roots extract samples under air on a glassy carbon electrode (GCE, BAS MF 4012, geometrical area 0.071 cm<sup>2</sup>). In order to mimic the natural environment, no degasification of the electrolyte was performed. Measurements were performed from -1.5V to 1.5V (red/ox), 1.5V to -1.5V (ox/red) and from 0 to 1.5V (short ox).

### ***Statistical analysis***

For each given date of the experiment, data were subjected to analyses of variance using a one-way analysis of variance (ANOVA) (SigmaPlot version 11, from Systat Software, Inc., San Jose California USA; [www.systatsoftware.com](http://www.systatsoftware.com)). One-way ANOVA followed by Tukey’s post hoc test was used to assess significant differences. Statistical significance was set at  $P \leq 0.05$ .

## RESULTS

### *Anatomical impact of Huanglongbing in diploid and tetraploid rootstock*

In the field, when grafted onto 2x citrumelo, Persian lime trees show higher growth compared with Mexican lime trees. When grafted onto 4x citrumelo, Persian lime and Mexican lime trees showed a more limited growth compared with tree associations with 2x citrumelo: Four years after planting and 2 years after natural HLB infection, tree height onto 4x rootstock were approximately 20% lower. The photosynthesis activity in Las- Mexican and Persian limes grafted onto 2x and 4x citrumelo were measured: stomatal conductance, transpiration and photosynthesis were decreased when associated to 4x rootstocks (data not shown). In Las+ asymptomatic leaves and symptomatic leaves of Mexican and Persian limes grafted onto 4x citrumelo, results were not significantly different than when grafted onto 2x citrumelo (data not shown). Leaf mottling induced by HLB were quite similar in Persian lime leaves whatever the rootstock ploidy. However, leaf yellowing in Mexican lime trees, were more limited when grafted onto 4x citrumelo compare to 2x citrumelo. SPAD and effective quantum yield of PSII values measured in symptomatic leaves of Mexican and Persian leaves grafted onto 4x citrumelo compared to the respective 2x citrumelo were higher (Suppl. Table 1). Investigations of phloem cells of Las+ Mexican and Persian lime grafted onto 4x citrumelo were performed. In asymptomatic petiole leaves, the presence of callose and the plugging of the pores were similar than in Mexican lime grafted onto 2x citrumelo (data not shown).

The infection by HLB in control and infected trees grown in greenhouse conditions were tested by qPCR. As expected, controls were negative, and trees infected by HLB were positive (Table 1). For infected trees, the copy number of the bacterium quantified in citrumelo 2x and 4x roots remained non-determined as if the bacterium was not present independently of the ploidy level of the scion grafted on it. Investigations of the bacterial load at root level remain limited, and we did not find in the literature results of CLas qPCR in citrumelo roots to compare with our results. We thus quantify CLas in root of sour orange that was previously shown to have high titer (Park et al., 2018). In that case, CLas titer was high, as in to petiole, Cts being close to 18. The unexpected results obtained in citrumelo 2x and 4x may be explained by an absence of the bacterium or an inhibition of the qPCR. This last hypothesis is supported by FISH analysis using a probe targeted against Las on the same amount of grounded root material. Interestingly, fluorescence in root of 2x citrumelo grafted with Persian lime was much higher than in root of 2x citrumelo grafted with Mexican lime (Suppl. Fig. 1, C & E). When grafted onto citrumelo 4x, the observed fluorescence was more limited (Suppl. Fig. 1, D & F). For Las+ asymptomatic (AS) petiole leaves, the titer of the bacterium quantified in Persian lime trees was much higher

than in Mexican lime trees (Ct of 28 versus 23; Table 1). Nevertheless, the use of 4x rootstock did not affect the titer of the bacterium in petiole.

Investigations were also performed at microscopic, and biochemical levels on trees grown in greenhouse conditions. Macroscopic pictures of secondary roots of Las- and Las+ roots showed a browning of the root color due to the disease (Figure 1). Tetraploid citrumelo secondary roots are thicker than 2x citrumelo with more limited numbers of very fines roots. Infection induced a degradation of fines roots in 2x citrumelo (Fig. 1, E & G versus C & A), whereas limited changes were observed in citrumelo 4x (Fig. 1, F & H versus D & B). To decipher the impact of the disease in the phloem, scanning microscopy analyses were performed in the leaf petioles of the different genotypes. The roots diameter and area were greater in citrumelo 2x than in citrumelo 4x (Table 2, Figure 2). In Las- and Las+ samples, the cortex, the phloem area, the xylem area, and the central cylinder were also greater in citrumelo 4x compared with citrumelo 2x. Interestingly, the infection caused a tissue and vessel collapse in 2x secondary roots of the Mexican lime/citrumelo 2x association tree but not in 2x secondary roots of the Persian lime /citrumelo 2x association (Fig. 2 B versus 2F respectively; Table 2). Transversal SEM of diploid and tetraploid citrumelo secondary roots did not allow to see the pores inside the walls of phloem cells (Suppl. Fig. 2). Longitudinal SEM were thus performed in Las- and Las+ secondary roots of diploid and tetraploid citrumelo (Figure 3). For the Las- and Las+ secondary roots, citrumelo 2x presented phloem cells and pores between cells that were smaller than in citrumelo 4x (Table 2; Fig. 3). No callose deposition and starch grains was observed in Las+ samples. Aniline blue staining in the same samples confirmed the absence of specific staining in the phloem and thus callose deposition in infected 2x and 4x secondary roots (Suppl. Figure 3).

#### *Electrochemical analysis of 2x and 4x secondary citrumelo roots infected by Huanglongbing*

Cyclic voltammograms (CV) of roots of 2x and 4x citrumelo immersed in air-saturated aqueous phosphate buffer at pH 7.0 were studied. Figure 4 compares the CV of glassy carbon electrode (GCE) in 2x (Figure 4A and B) or 4x (Figure 4C and D) citrumelo roots grafted with Mexican lime (Figure 4A and C) or Persian lime (Figure 4B and D) infected or not by HLB. For the analysis of grafted citrumelo reaction to the infection, we focused our study on the scanning of the potential in the negative direction (Fig. 4). In the case of 2x citrumelo grafted with Mexican lime, healthy roots (Figure 4A, green curve) displayed a cathodic signal at ca.  $-1.0$  V ( $C_1$ ) and a weak anodic wave ( $A_1$ ) ca.  $0.7$  V preceding a rising current at ca.  $1.4$  V corresponding to the

second anodic signal ( $A_2$ ) superimposed to the oxygen evolution reaction (OER). The cathodic signal  $C_1$  is superimposed to the reduction of dissolved oxygen ( $C_{ox}$ ), as denoted by blank experiments at unmodified GCE. In the case of cathodic scan of infected roots (Figure 4B, red curve), a similar reduction signal in the same region of potentials than  $C_1$  was detected with clearly lower intensity while the anodic wave  $A_1$  becomes also lowered. Similar reduction signals were detected in the case of 2x citrumelo grafted with Persian lime (Figure 4B). This signal, however, is dramatically depleted in the Las+ roots. Figure 4C presents the cyclic voltammograms recorded at GCEs modified with films of 4x citrumelo secondary roots grafted with Mexican lime (2x). Upon scanning the potential in the negative direction, healthy roots present two cathodic signals at ca.  $-0.8$  ( $C_2$ ) and  $-1.35$  ( $C_3$ ) V. These signals appear at potential clearly different than the signal  $C_1$  recorded with the 2x citrumelo CVs. The voltammograms of the infected roots show a decrease in the intensity of the peak  $C_2$  and the disappearance of the peak  $C_3$ , which is apparently substituted by a cathodic signal at  $-1.45$  V ( $C_4$ ). Finally, a cyclic voltammogram was recorded at GCEs modified with films of roots of 4x citrumelo grafted with Persian lime (Figure 4D). Cathodic signals at ca.  $-0.8$  ( $C_2$ ) and  $-1.35$  ( $C_2$ ) V were again recorded. In Las+ trees, a new signal at ca.  $-0.95$  V ( $C_5$ ) appeared replacing the signals of healthy sample ( $C_2$  and  $C_3$ ). The signal  $C_4$  appearing at 4x citrumelo grafted with Mexican lime (Fig. 4C) was entirely absent here whereas the strong  $A_2 + OER$  signal was considerably decreased as occurring in 2x citrumelo grafted with Persian lime (Figure 4B). Interestingly, the  $C_5$  peak is essentially coincident with the peak  $C_1$  recorded for 2x forms (Figs. 4A, 1B).

*Polyphenol content and tissue structure in 2x and 4x secondary citrumelo roots infected by Huanglongbing*

Polyphenol contents were estimated in 2x and 4x citrumelo roots infected or not by HLB. Methanol extracts were applied to microparticulate films on glassy carbon electrodes in contact with aqueous buffer to obtain information on selected chemical main components associated with the disease. In Las- the polyphenol contents were limited ( $<30$   $\mu\text{g/mL}$ ) but were all the time higher in 4x roots compared to 2x (Figure 5). Interestingly, trees grafted with Persian lime presented greater polyphenol contents in roots than when grafted with Mexican lime. In Las+ root samples, polyphenols contents were dramatically increased. Tetraploid roots displayed a greater increase compared to 2x. To end, the scion also influenced the polyphenols contents in Las+ 2x and 4x citrumelo roots: a two-fold increase of the polyphenol root contents were measured when grafted with Persian lime compared to Mexican lime whatever the ploidy level

of the rootstock (Figure 5).

Investigation were performed by TEM in order to visualize the presence of Las and its possible implication at the cellular level. Cross sections of phloem cells in Las- samples allowed to see the presence of the pores allowing the transfer of the sap between cells (Figure 6, A to F). In 4x root samples cell walls were thicker as expected with a mean thickness of  $1104 \pm 65 \mu\text{m}$  compared to  $654 \pm 39 \mu\text{m}$  for 2x roots (Figure 6A-D). In Las+ samples, Las was clearly visible whatever the ploidy status of the rootstock (Figure 6E-F). Las was present close to the pores and the cell walls. Degradation of cell walls was not obvious in 2x roots when compared to 4x.

## **DISCUSSION**

### ***Anatomical differentiation between Mexican lime and Persian lime trees grafted on citrumelo 2x and 4x***

In the field, when grafted onto citrumelo 2x, infected Persian lime (3x) scion showed higher growth compared with infected Mexican lime (2x) scion (Sivager et al., 2021). Such phenotypic differentiation associated with polyploidy has been reported in numerous studies (for review, see Ruiz et al., 2020). Among them, one may quote to greater sizes cell, organ sizes and higher leaf greenness (Mouhaya et al., 2010; Allario et al., 2011 ; Sivager et al., 2021). When grafted onto citrumelo 4x, the height of Mexican lime and Persian lime scions were smaller than when grafted onto the respective 2x citrumelo as previously observed (Hussain et al., 2012). Our investigation showed that 4x citrumelo induced more limited values of the photosynthesis activity in Mexican and Persian limes (data not shown). Previous investigations showed that the polyploidy in roots and canopies has an antagonist effect on photosynthetic and respiratory function. The photosynthetic activities of 4x seedlings (Allario et al., 2011) and 2x sweet orange grafted on 4x rootstocks (Allario et al., 2013) were shown to be reduced compared to plants with diploid root systems. This reduction was associated with higher constitutive ABA biosynthesis in tetraploid roots (Allario et al., 2013). In the field, we also showed that the tree size reduction in clementine scion was related to the use of 4x rootstocks, was indeed related a more limited activity of the photosynthesis (Hussain et al., 2012).

The investigation of secondary roots of citrumelo 2x and 4x showed the 4x were thicker and less numerous than in 2x (Fig. 1 & 2, Table 2) as previously mentioned (Allario et al., 2011; Oliveira et al., 2017). Such phenotype has been associated to better tolerance to abiotic stress such as water deficit (Allario et al., 2013).

### ***Anatomical characterization of the secondary roots of citrumelo 2x and 4x grafted with Mexican and Persian lime cultivars grown under HLB stress***

Previous observations in the field showed that the Persian lime trees were much less affected than Mexican lime trees regarding HLB, which fits other observations (Gómez et al., 2008; Deng et al., 2019, Sivager et al, 2021). This tolerance was associated with the maintenance of vigorous growth and fruit yield. In greenhouse conditions, we observed that when grafted onto 2x citrumelo, infected Mexican lime leaves were much more yellow than Persian lime leaves (Sivager et al., 2021). Interestingly, Mexican lime leaf yellowing and leaf mottling were more limited when grafted onto 4x citrumelo rootstock suggesting a benefic impact regarding HLB of the rootstock on the scion. The greater values of SPAD and effective quantum yield of PSII

measured in symptomatic leaves of Mexican and Persian leaves grafted onto 4x citrumelo compared to the respective 2x citrumelo are in agreement with this hypothesis (Suppl. Table 1). Koh et al., (2012) showed that HLB leads to increased callose synthesis in the phloem vessels, resulting in clogging of the pores at the sieve plate between cells (Achor et al., 2010 ; Sivager et al, 2021). The specific phenology of the Persian lime, with a slower plugging of phloem cell pores and a better phloem regeneration (Deng et al., 2019), is in agreement with a longer leaf lifetime of that genotype in comparison to the Mexican lime genotype (Sivager et al., 2021). Investigation by SEM of Las+ petiole asymptomatic phloem cells of Mexican and Persian lime grafted onto 4x citrumelo did not allow to show a more limited clogging of the pores compared to the same scions grafted onto 2x citrumelo (data not shown) suggesting that the callose deposition was not impacted by the rootstock status. We thus investigated the impact of HLB at the root level. Interestingly, HLB induced a browning of the root color, with a degradation of fines roots in 2x citrumelo that was much more important than in 4x citrumelo (Fig. 1). To verify whether the tetraploidy in the root may favor a better adaptation to HLB due to more limited intercellular sieve pore plugging, we performed SEM. Transversal cross sections did not allow to visualize the pores in the secondary root phloem cells because of their longer size and the limited chance to cut at the right place when preparing the samples (Suppl Fig. 2). Indeed, the length of phloem cells were most of the time > 150µm favoring in turn long distance transport of the sap without cell walls to cross. Longitudinal SEM of secondary roots allowed to confirm that phloem cells and sieve plate pores of citrumelo 4x were larger than those of citrumelo 2x. In HLB-infected secondary roots the phloem cell sieve pores were found not to be obstructed by callose deposition, whatever the ploidy status of the rootstock, as previously reported (Achor et al., 2020). According to these authors (Achor et al., 2020), the maintaining phloem sap flux due to a non callose deposition at the sieve plate of the phloem cells explain why the roots would be the bacterial reservoir. Thus, roots degradation would be more likely related to a direct impact of the bacterium than to perturbation of sieve flux. Also better phloem regeneration proposed by Deng et al., (2019) in tolerant genotypes, may also occur in 4x roots and favor the adaptation to HLB.

### ***Differential response to oxidative stress in the Mexican and Persian limes***

Oxidative stress genes coding for antioxidant enzymes were shown to be upregulated in HLB-susceptible citrus compared with tolerant citrus (Tang and Vashisth, 2020), which induces mature-fruit drop in HLB-infected citrus trees. Our previous results showed that in Persian lime,

detoxification processes favored the maintaining of the phloemic flow in the plant and, thus, resulted in a better HLB-tolerance (Sivager et al., 2021). In Persian lime leaves, greater MDA contents and stronger APX and CAT activities were measured compared to Mexican lime.

The voltammetry of immobilized microparticles (VIMP) is a solid state electrochemical technique developed by Scholz et al. (Scholz and Meyer 1998; Scholz et al. 2014), which is capable of providing analytical information on a variety of sparingly soluble solids (Doménech-Carbó et al. 2013a). The use of VIMP was previously described for defining electrochemolomic profiles at the taxonomic level (Doménech-Carbó et al., 2015a) and for monitoring plant defense responses to external stress (Doménech-Carbó et al., 2015b). We evaluated the voltammetric response in 2x and 4x citrumelo roots of infected and control trees in order to decipher the induced oxidative stress. On figure 5A, the voltammetric response can be interpreted in terms of the reduction ( $C_1$ ) and oxidation ( $A_1$ ) of electroactive components of Citrumelo 2x grafted with Mexican lime that become total or partially inactivated upon infection so that the  $C_1$  wave is abruptly lowered. In 2x citrumelo grafted with Persian lime (Figure 5B), the dramatic decrease of the signal in the Las+ roots suggests that i) antioxidant components oxidizable at high potentials are promoted in Citrumelo 2x/Persian lime relative to those in Citrumelo 2x/Mexican lime; ii) such antioxidant components are quite sensitive to the infection.

Cyclic voltammograms in roots of 4x citrumelo grafted with Mexican lime showed signals at potential clearly different than the signal  $C_1$  recorded with the diploid citrumelo CVs (Figure 5C). Accordingly, these signals can be attributed to two the reduction of different natural products. The voltammograms of the infected roots show a decrease in the intensity of the peak  $C_2$  and the disappearance of the peak  $C_3$ , which is apparently substituted by a cathodic signal at  $-1.45$  V( $C_4$ ). These results are in agreement with a higher tolerance to HLB of 4x citrumelo compared with 2x rootstocks. In this case, the  $A_2$  plus OER signal is high but, in contrast with in citrumelo 2x/Persian lime, the infection does not decrease its intensity (Figure 5C). Since these are reduction peaks, the compound(s) responsible for the signals  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ , are not antioxidants (they should be easily oxidized); these compounds would be “antireductants”.

In 4x citrumelo grafted with Persian lime, the cyclic voltammograms recorded at GCEs modified with films of roots of tetraploid citrumelo (Figure 5D) showed that the cathodic region of the voltammograms of 4x citrumelo forms clearly differ from that of the diploid forms. This cathodic region was much more sensitive to the infection by HLBs than the corresponding



region of the 2x ones. Thus, this strong modification confirms the higher reactivity of 4x citrumelo against the infection. To end the anodic region of the infected grafted forms (both 2x and 4x) experiences sharp differences with the anodic region of the corresponding pristine forms.

Polyphenol contents analysis in 2x and 4x citrumelo roots were very contrasted (Figure 5). VIMP method has been applied to test antioxidant properties of fruits and vegetables (Komorsky-Lovrić and Novak, 2011), to screen impurities in herbal remedies (Doménech-Carbó et al., 2013b), and to test the reactivity of plant compounds with reactive oxygen species (ROS; Doménech-Carbó et al., 2015c). If in Las- root samples, contents were quite low, 4x presented all the time higher contents than in 2x whatever the scion. Those results would be in agreement with pre-adaptation to stress by limiting oxidative stress as previously proposed for polyploid genotypes (Sanwal et al., 2010; Allario et al., 2013; Kong et al., 2017). Interestingly, HLB infection by HLB led to a 10-fold increase of the polyphenol contents that was stronger in 4x roots compared to 2x. Since polyphenols play a crucial role in plant–environmental adaptation because their role in biotic (Cheynier et al., 2013) and abiotic stress (Cheruiyot et al., 2007; Šamec et al., 2021; Tuladhar et al., 2021) defense, which is commonly attributed to their antioxidant activity (Martinelli et al., 2016), polyphenol may contribute to the better adaptation of polyploid to HLB. The increase was even stronger when 4x rootstock were grafted with triploid Persian lime, underlining the importance of the polyploid rootstock-scion interactions as a tool to limit the oxidative stress induced by HLB. Finally, thanks to the TEM investigations performed in the root phloem cells, the presence of Las in infected 2x and 4x citrumelo secondary roots was clearly demonstrated. However, this method was not adapted to quantify the bacterium within the tissues and did not allow to link cell wall degradation and membrane perturbation to detoxification processes as observed in the 4x root (Figure 5).

## **CONCLUSION**

In the field, the 3x Persian grafted onto diploid citrumelo showed to be much more tolerant to HLB when compared to the 2x Mexican lime (Sivager et al., 2021). In this present article, we investigated the same scion-varieties grafted onto 2x and 4x citrumelo and we focused our investigation at the root compartment. Anatomical, physiological, and biochemical differentiations due to ploidy variation explain a large part of the better behavior citrumelo 4x / 2x and 3x associations (Figure 7). Indeed, if the pores of 2x and 4x phloem root cells were not plugged by callose in Las+ samples, oxidative stress in 2x roots was much more effective and

was associated to lower polyphenols contents which may in turn explain the greater root degradation observed in citrumelo 2x / 2x and 3x associations. Interestingly, our findings demonstrate that the scion strongly impact the tolerance to HLB, which is even improved when associated to 4x rootstock. Thus, further investigations are required to decipher the molecular determinants of the better HLB-tolerance of polyploid rootstocks and scions as well as the polyploid rootstock / scion interactions.

#### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

GS, LC, SB, RB and BH, performed the experiments and collected the physiological data. GS, A D-C, G C-T and RM performed the statistical analyses, interpreted the results, and drafted the manuscript. GS and OG performed the analyses by SEM & TEM. BH and OG helped to draft the manuscript.

#### **FUNDING**

GS and LC were supported by the “Collectivité Territoriale de Martinique” and the “Région Guadeloupe”. Investigations were supported by the “TROPICSAFE” project funded by European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 727459 and the “CAVALBIO” project funded by FEDER and the Guadeloupe Region (2015-2021).

#### **CONFLICT OF INTEREST**

None declared

## REFERENCES

- Achor, D. S., Etxeberria, E., Wang, N., Folimonova, S. Y., Chung, K. R., and Albrigo, L. G. (2010). Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. *Plant Pathol. J.* 9, 56–64. doi:10.3923/ppj.2010.56.64.
- Achor, D., Welker, S., Ben-Mahmoud, S., Wang, C., Folimonova, S. Y., Dutt, M., et al. (2020). Dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* Movement and Sieve-Pore Plugging in Citrus Sink Cells1[OPEN]. *Plant Physiol.* 182, 852–891. doi:10.1104/pp.19.01391.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., and Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.* 196, 67–76. doi:10.1016/j.plantsci.2012.07.014.
- Aleza, P., Froelicher, Y., Schwarz, S., Agustí, M., Hernández, M., Juárez, J., et al. (2011). Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. *Ann. Bot.* 108, 37–50. doi:10.1093/aob/mcr099.
- Allario, T., Brumos, J., Colmenero-Flores, J. M., Iglesias, D. J., Pina, J. A., Navarro, L., et al. (2013). Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant. Cell Environ.* 36, 856–868. doi:10.1111/pce.12021.
- 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.
- Alves, M. N., Lopes, S. A., Raiol-Junior, L. L., Wulff, N. A., Girardi, E. A., Ollitrault, P., et al. (2021). Resistance to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ the Huanglongbing Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible Citrus Relatives. *Front. Plant Sci.* 11, 1–16. doi:10.3389/fpls.2020.617664.
- Bhattacharjee, S. (2012). The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *J. Bot.* 2012, 1–22. doi:10.1155/2012/985298.
- Blaustein, R. A., Lorca, G. L., and Teplitski, M. (2018). Challenges for Managing *Candidatus Liberibacter* spp. (Huanglongbing Disease Pathogen): Current Control Measures and Future Directions. *Phytopathology*® 108, 424–435. doi:10.1094/phyto-07-17-0260-rvw.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88, 7–37. doi:10.4454/jpp.v88i1.828.
- Brissac, T., Rodrigues, C. F., Gros, O., and Bastien Duperron, S. Characterization of bacterial

- symbioses in *Myrtea* sp. (Bivalvia: Lucinidae) and *Thyasira* sp. (Bivalvia: Thyasiridae) from a cold seep in the Eastern Mediterranean. doi:10.1111/j.1439-0485.2010.00413.x.
- Bruyère, O., Altman, R. D., and Reginster, J. Y. (2016). Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. *Semin. Arthritis Rheum.* 45, S12–S17. doi:10.1016/j.semarthrit.2015.11.011.
- Cheruiyot, E. K., Mumera, L. M., Ng’etich, W. K., Hassanali, A., and Wachira, F. (2007). Polyphenols as potential indicators for drought tolerance in tea (*Camellia sinensis* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2190–2197. doi:10.1271/BBB.70156.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., and Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 72, 1–20. doi:10.1016/J.PLAPHY.2013.05.009.
- Dala-Paula, B. M., Plotto, A., Bai, J., Manthey, J. A., Baldwin, E. A., Ferrarezi, R. S., et al. (2019). Effect of huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. *Front. Plant Sci.* 9. doi:10.3389/fpls.2018.01976.
- Deng, H., Achor, D., Etxeberria, E., Yu, Q., Du, D., Stanton, D., et al. (2019). Phloem regeneration is a mechanism for huanglongbing-tolerance of “bearss” lemon and “LB8-9” sugar belleopensisupspi@closepsisupspi mandarin. *Front. Plant Sci.* 10, 277. doi:10.3389/fpls.2019.00277.
- Doménech-Carbó, A., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., and Domínguez, I. (2015). Contact probe voltammetry for in situ monitoring of the reactivity of phenolic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) compounds with ROS. *Talanta* 144, 1207–1215. doi:10.1016/J.TALANTA.2015.07.092.
- Doménech-Carbó, A., Martini, M., de Carvalho, L. M., Viana, C., Doménech-Carbó, M. T., and Silva, M. (2013). Screening of pharmacologic adulterant classes in herbal formulations using voltammetry of microparticles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 74, 194–204. doi:10.1016/J.JPBA.2012.10.031.
- Ed Etxeberria, Narciso, C., Sood, P., Gonzalez, P., and Narcis, J. (2009). The Anatomy of a Laser Label. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 122, 347–349. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/9a7a/ad03e1d9e88599d889822d35c6a82bcbb675.pdf>.
- Ed Stover, Gregory T. McCollum, Randall Driggers, Richard Lee, Robert Shatters Jr., YongPing Duan, et al. (2015). Resistance and tolerance to Huanglongbing in Citrus. *Acta Hort.* 1065, 899–903. doi:10.17660/ActaHortic.2015.1065.111.
- Froelicher, Y., Bassene, J. B., Jedidi-Neji, E., Dambier, D., Morillon, R., Bernardini, G., et al. (2007). Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: Induction

- procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Rep.* 26, 937–944. doi:10.1007/s00299-007-0314-y.
- Gómez, H. D., En, H. L. B., and Florida, L. A. (2008). Experiences on Hlb ( Huanglongbing ) Symptoms Detection in Florida. *Response*, 1–7.
- Graham, J. H., Johnson, E. G., Gottwald, T. R., and Irey, M. S. (2013). Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. *Plant Dis.* 97, 1195–1199. doi:10.1094/PDIS-01-13-0024-RE.
- Grosser, J., Omar, A., Gmitter, J., and Syvertsen, J. P. (2012). Salinity tolerance of ‘ Valencia ’ Orange trees on allotetraploid rootstocks. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 50–55.
- Grosser, J. W., and Gmitter, F. G. (2011). Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: Applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 104, 343–357. doi:10.1007/s11240-010-9823-4.
- Hilf, M. E., Sims, K. R., Folimonova, S. Y., and Achor, D. S. (2013). Visualization of ‘ Candidatus Liberibacter asiaticus ’ Cells in the Vascular Bundle of Citrus Seed Coats with Fluorescence In Situ Hybridization and Transmission Electron Microscopy. 103.
- Huang, C. Y., Araujo, K., Sánchez, J. N., Kund, G., Trumble, J., Roper, C., et al. (2021). A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118, 2021. doi:10.1073/pnas.2019628118.
- Hussain, S., Curk, F., Dhuique-Mayer, C., Urban, L., Ollitrault, P., Luro, F., et al. (2012). Autotetraploid trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) rootstocks do not impact clementine quality but reduce fruit yields and highly modify rootstock/scion physiology. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 134, 100–107. doi:10.1016/J.SCIENTA.2011.11.008.
- Jagoueix, S., Bove, J. M., and Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the  $\alpha$  subdivision of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 379–386. doi:10.1099/00207713-44-3-379.
- Johnson, E. G., Wu, J., Bright, D. B., and Graham, J. H. (2013). Association of ‘ Candidatus Liberibacter asiaticus ’ root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathol.* 63, 290–298. doi:10.1111/ppa.12109.
- Koh, E. J., Zhou, L., Williams, D. S., Park, J., Ding, N., Duan, Y. P., et al. (2012). Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “Candidatus Liberibacter asiaticus.” *Protoplasma* 249, 687–697. doi:10.1007/s00709-011-0312-3.
- Koh, J., Morales-Contreras, B. E., Guerra-Rosas, M. I., Osorio-Hernández, E., Culver, C. A.,

- Morales-Castro, J., et al. (2020). Huanglongbing disease and quality of pectin and fruit juice extracted from Valencia oranges. *LWT* 131, 109692. doi:10.1016/j.lwt.2020.109692.
- Komorsky-Lovrić, Š., and Novak, I. (2011). Abrasive stripping square-wave voltammetry of blackberry, raspberry, strawberry, pomegranate, and sweet and blue potatoes. *J. Food Sci.* 76. doi:10.1111/J.1750-3841.2011.02256.X.
- Kong, D., Li, Y., Bai, M., Deng, Y., Liang, G., and Wu, H. (2017). A comparative study of the dynamic accumulation of polyphenol components and the changes in their antioxidant activities in diploid and tetraploid *Lonicera japonica*. *Plant Physiol. Biochem.* 112, 87–96. doi:10.1016/J.PLAPHY.2016.12.027.
- Kumar, N., Kiran, F., and Etxeberria, E. (2018). Huanglongbing-induced Anatomical Changes in Citrus Fibrous Root Orders. *HortScience* 53, 829–837. doi:10.21273/HORTSCI12390-17.
- Kumar, S., and Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci. World J.* 2013. doi:10.1155/2013/162750.
- Luro, F., Bloquel, E., Tomu, B., Costantino, G., Tur, I., Riolacci, S., et al. (2017). “The INRA-CIRAD citrus germplasm collection of San Giuliano, Corsica,” in *AGRUMED: Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean: Acclimatization, diversifications, uses [en ligne]* (Naples: Publications du Centre Jean Bérard). doi:10.4000/books.pcbj.2232.
- Martinelli, F., Reagan, R. L., Dolan, D., Fileccia, V., and Dandekar, A. M. (2016). Proteomic analysis highlights the role of detoxification pathways in increased tolerance to Huanglongbing disease. *BMC Plant Biol.* 16, 167. doi:10.1186/s12870-016-0858-5.
- Miles, G. P., Stover, E., Ramadugu, C., Keremane, M. L., and Lee, R. F. (2017). Apparent tolerance to Huanglongbing in Citrus and Citrus-related germplasm. *HortScience* 52, 31–39. doi:10.21273/HORTSCI11374-16.
- Mouhaya, W., Allario, T., Brumos, J., Andrés, F., Froelicher, Y., Luro, F., et al. (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. doi:10.1071/FP10035.
- Neupane, D., and Moss, C. B. (2016). Estimating Citrus Production Loss due to Citrus Huanglongbing in Florida Estimating Citrus Production Loss Due to Citrus Huanglongbing in Florida. 6–9.
- Oliveira, T. M., Yahmed, J. Ben, Dutra, J., Maserti, B. E., Talon, M., Navarro, L., et al. (2017). Better tolerance to water deficit in doubled diploid ‘Carrizo citrange’ compared to diploid

- seedlings is associated with more limited water consumption. *Acta Physiol. Plant.* 39. doi:10.1007/S11738-017-2497-3.
- Palmeira-Mello, M. V., Souza, J. L., Pérez, A. F., Cavalcanti, A. dos S., Kahn, S. A., Passeur-Coutrin, N., et al. (2021). Insights of Tris(2-pyridylmethyl)amine as anti-tumor agent for osteosarcoma: experimental and in silico studies. *J. Mol. Struct.* 1228, 129773. doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2020.129773.
- Park, J. W., Louzada, E. S., Braswell, W. E., Stansly, P. A., da Graça, J. V., McCollum, G., et al. (2018). A new diagnostic real-time PCR method for Huanglongbing detection in citrus root tissue. *J. Gen. Plant Pathol.* 84, 359–367. doi:10.1007/S10327-018-0793-4/FIGURES/5.
- Ramadugu, C., Keremane, M. L., Halbert, S. E., Duan, Y. P., Roose, M. L., Stover, E., et al. (2016). Long-term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in Citrus relatives. *Plant Dis.* 100, 1858–1869. doi:10.1094/PDIS-03-16-0271-RE.
- Richardson, M. L., and Hall, D. G. (2013). Resistance of poncirus and citrus × poncirus germplasm to the asian citrus psyllid. *Crop Sci.* 53, 183–188. doi:10.2135/cropsci2012.02.0091.
- Ruiz, M., Oustric, J., Santini, J., and Morillon, R. (2020). Synthetic Polyploidy in Grafted Crops. *Front. Plant Sci.* 11. doi:10.3389/fpls.2020.540894.
- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., and Salopek-Sondi, B. (2021). The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants* 2021, Vol. 10, Page 118 10, 118. doi:10.3390/PLANTS10010118.
- Sanwal, S. K., Rai, N., Singh, J., and Buragohain, J. (2010). Antioxidant phytochemicals and gingerol content in diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 124, 280–285. doi:10.1016/J.SCIENTA.2010.01.003.
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., and Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* 24, 1–22. doi:10.3390/molecules24132452.
- Sivager, G., Calvez, L., Bruyere, S., Boisne-noc, R., Brat, P., Gros, O., et al. (2021). Specific Physiological and Anatomical Traits Associated With Polyploidy and Better Detoxification Processes Contribute to Improved Huanglongbing Tolerance of the Persian Lime Compared With the Mexican Lime. 12, 1–14. doi:10.3389/fpls.2021.685679.
- Tang, L., and Vashisth, T. (2020). New insight in Huanglongbing-associated mature fruit drop in citrus and its link to oxidative stress. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 265, 109246. doi:10.1016/j.scienta.2020.109246.

- Tania Santivañez C., Gustavo Mora Aguilera, Gabriel Díaz Padilla, José Isabel López Arrollo, P. V. H. (2013). *Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe*.
- Teixeira, D. D. C., Danet, J. L., Eveillard, S., Martins, E. C., De Jesus, W. C., Yamamoto, P. T., et al. (2005). Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “Candidatus” Liberibacter species associated with the disease. *Mol. Cell. Probes* 19, 173–179. doi:10.1016/j.mcp.2004.11.002.
- Tuladhar, P., Sasidharan, S., and Saudagar, P. (2021). Role of phenols and polyphenols in plant defense response to biotic and abiotic stresses. *Biocontrol Agents Second. Metab.*, 419–441. doi:10.1016/B978-0-12-822919-4.00017-X.
- Westbrook, C. J., Hall, D. G., Stover, E., Duan, Y. P., and Lee, R. F. (2011). Colonization of Citrus and Citrusrelated germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *HortScience* 46, 997–1005. doi:10.21273/hortsci.46.7.997.



**Table 1. Quantitative real-time PCR in roots of Citrumelo 4475 2x and 4x and petioles from Mexican and Persian limes of the control (Las-) and infected samples (Las+).** For petiole, asymptomatic leaves were selected. Ct results are expressed as mean +SE (n=3).

Rootstock	Scion	Las-		Las+	
		Root	Petiole	Root	Petiole
Citrumelo 2x	Mexican lime	ND	ND	ND	22.58 ± 0.73 a
Citrumelo 2x	Persian lime	ND	ND	ND	26.51 ± 0.69 b
Citrumelo 4x	Mexican lime	ND	ND	ND	22.85 ± 0.45 a
Citrumelo 4x	Persian lime	ND	ND	ND	27.81 ± 0.30 b

**Table 2. Anatomical characterization of diploid (2x) or tetraploid (4x) Citrumelo Swingle 4475 roots grafted with Mexican lime (2x) or Tahiti lime (3), infected (Las+) or not (Las-) by *Candidatus Liberibacter asiaticus*.** Results are express as the mean ± SE (n=8 to 25). Anova tests were performed to determine if HLB led to significant differences.

	Las-				Las+			
	Mexican lime		Persian lime		Mexican lime		Persian lime	
	Cit 2x	Cit 4x	Cit 2x	Cit 4x	Cit 2x	Cit 4x	Cit 2x	Cit 4x
<b>Roots diameter (mm ± SE)</b>	2.0 ± 0.3 b	3.2 ± 0.2 c	2.1 ± 0.2 b	3.6 ± 0.2 c	1.3 ± 0.1 a	3.7 ± 0.2 c	1.9 ± 0.2 b	3.5 ± 0.1 c
<b>Roots area (µm<sup>2</sup> ± SE)</b>	1844228 ± 137256 b	4061130 ± 5525 c	2282794 ± 650487 b	4418763 ± 387606 c	1245116 ± 169565 a	4456783 ± 512842 c	1730391 ± 187135 ab	43188613 ± 430822 c
<b>Cortex area (µm<sup>2</sup> ± SE)</b>	1638197 ± 117490 b	3493397 ± 155576 d	2000482 ± 572185 bc	3847399 ± 246901 d	1007908 ± 147775 a	4460485 ± 314249 d	1912855 ± 49466 c	3712759 ± 350772 d
<b>Phloem area (µm<sup>2</sup> ± SE)</b>	50117 ± 7018 ab	168679 ± 48079 d	66560 ± 16565 b	100230 ± 6637 c	42938 ± 3384 a	240533 ± 33692 d	72616 ± 2909 b	163728 ± 20463 d
<b>Phloem cell area (µm<sup>2</sup> ± SE)</b>	444 ± 43 a	637 ± 59 b	458 ± 18 a	705 ± 62 b	890 ± 103 b	804 ± 64 b	839 ± 97 b	877 ± 106 b
<b>Area of the pores of phloem cells (µm<sup>2</sup>)</b>	1.1 ± 0.2 a	2.1 ± 0.1 b	1.4 ± 0.1 a	2.2 ± 0.2 b	1.5 ± 0.1 a	2.2 ± 0.1 b	1.2 ± 0.1 a	2.3 ± 0.1 b

$\pm$ SE)								
<b>Xylem area (<math>\mu\text{m}^2 \pm</math> SE)</b>	65404 $\pm$	260109 $\pm$	126557 $\pm$	294223 $\pm$	67196 $\pm$	393654 $\pm$	111796 $\pm$	316340 $\pm$
	3574	61723	19918	60531	2474	58604	5548	57269
	a	c	b	c	a	c	b	c
<b>Central cylinder area (<math>\mu\text{m}^2 \pm</math> SE)</b>	164687 $\pm$	404791 $\pm$	167617 $\pm$	387409 $\pm$	132275 $\pm$	494866 $\pm$	218919 $\pm$	429525 $\pm$
	17597	80462	22661	24934	6643	66518	12855	31188
	a	b	a	b	a	b	a	b

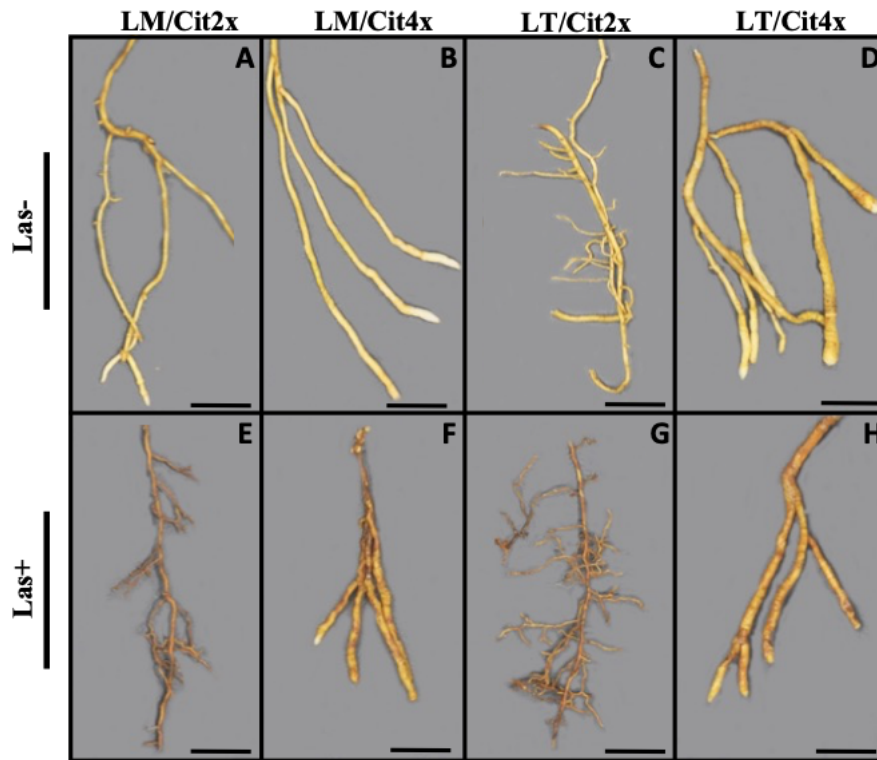


Figure 1. Macroscopic pictures of 2x and 4x Citrumelo 4475 secondary roots in control (Las-) and HLB infected (Las+) trees. Bars = 1cm.

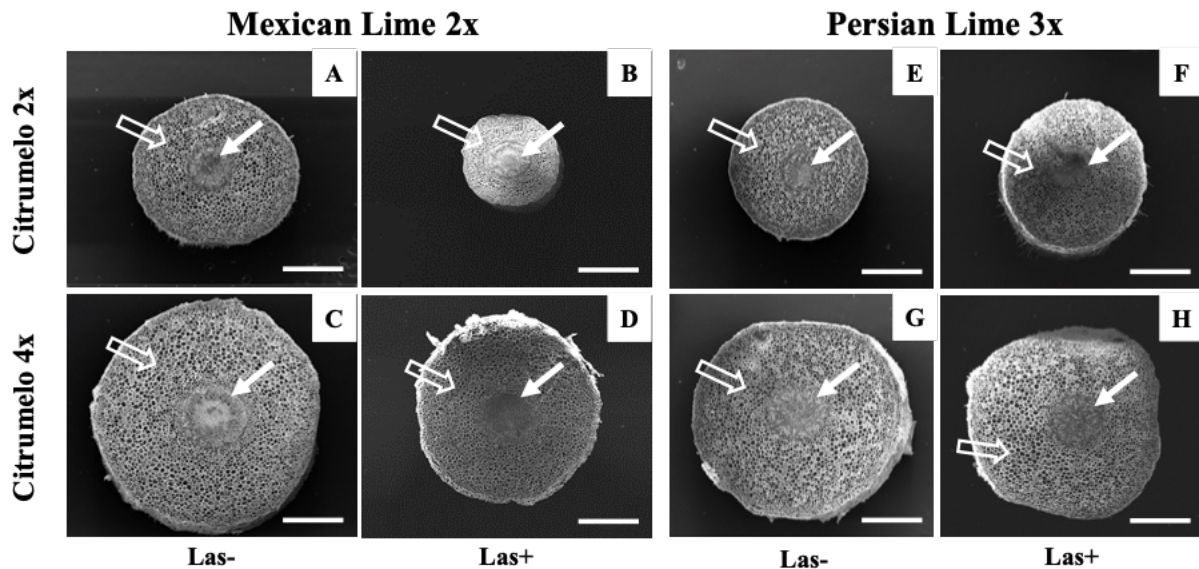


Figure 2. Transversal SEM pictures of diploid (2x) and tetraploid (4x) roots of Citrumelo 4475 grafted with 2x or 3x limes infected or not by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las). Full white arrows show the central cylinder (phloem & xylem) of the root and empty white arrows show the root cortex. Bars = 0.5mm.

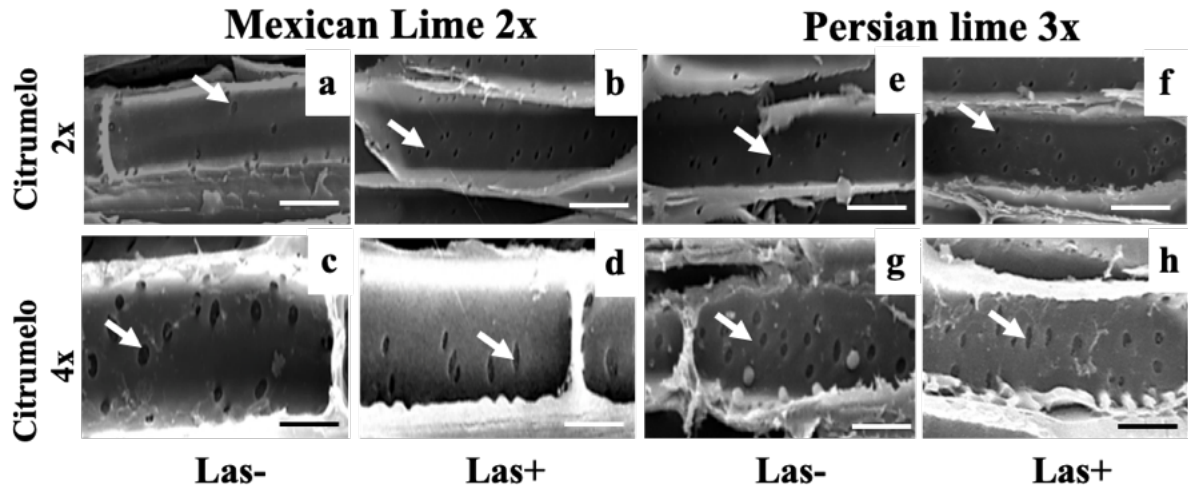
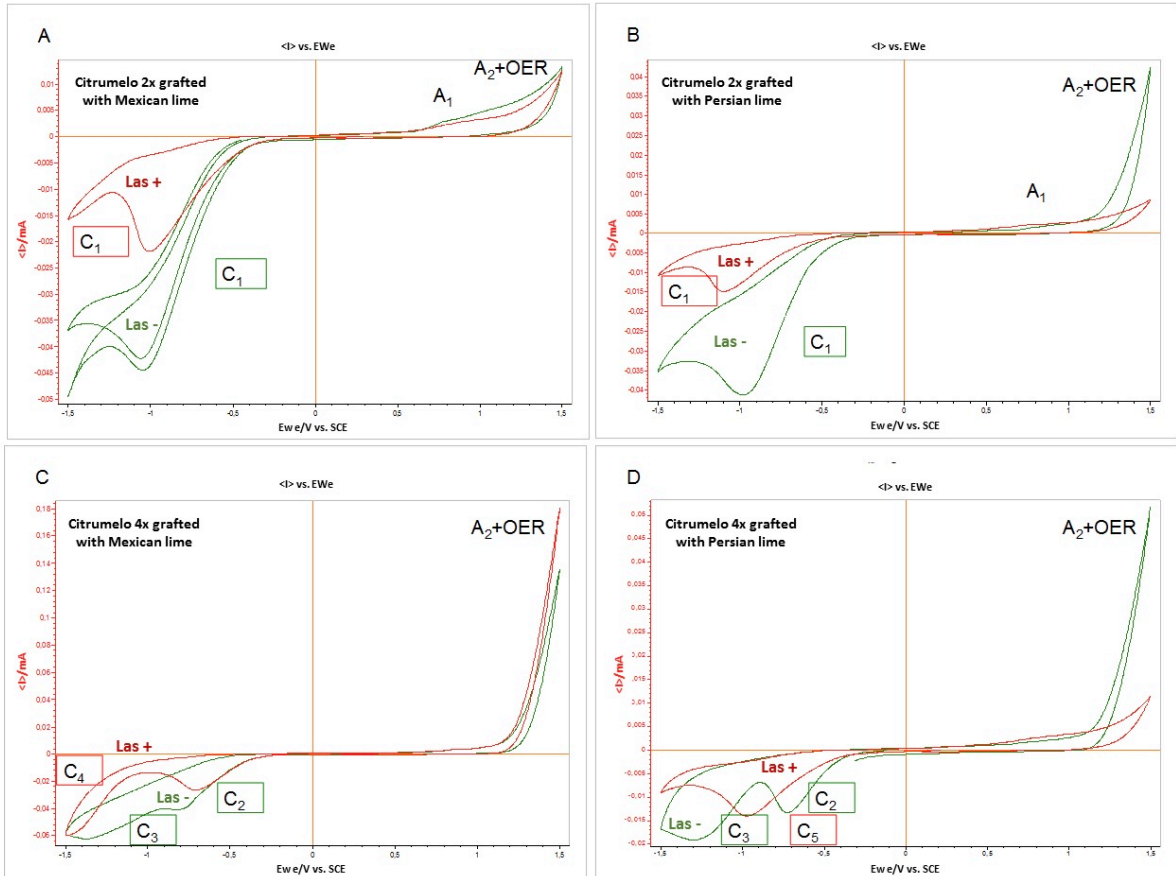
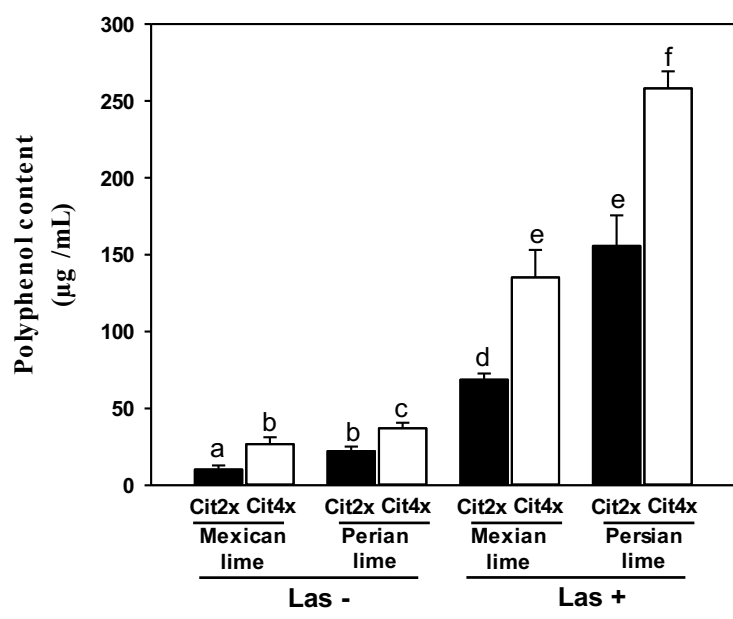


Figure 3. Longitudinal SEM of diploid (2x) and tetraploid (4x) root phloem cells of Citrumelo 4475 grafted with 2x or 3x limes infected (Las+) or not (Las-) by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las). White arrows indicate the pores in the phloem cell wall. Bars = 15µm.



**Figure 4.** CV profiles of diploid (2x) or tetraploid (4x) roots of Citrumelo 4475 rootstocks grafted with Mexican lime (2x) or Persian lime (3x) infected (Las+, red curves) or not (Las-, green curves) by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **A.** Citrumelo 4475 (2x)/Mexican lime (2x); **B.** Citrumelo 4475 (2x)/Persian lime (3x); **C.** Citrumelo 4475 (4x)/Mexican lime (2x); **D.** Citrumelo 4475 (4x)/Persian lime (3x). Potential scan initiated at 0.0 V in the negative direction; potential scan rate 10 mV s<sup>-1</sup>.



**Figure 5. Polyphenols content in diploid (2x) and tetraploid (4x) roots of Citrumelo 4475 rootstocks grafted with Mexican lime (2x) and Persian lime (3x) infected (Las+) or not (Las-) by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Cit2x and Cit4x mean respectively citrumelo 2x and citrumelo 4x. Data with a different letter are statistically different. Vertical bars indicate the mean value  $\pm$  SE.**

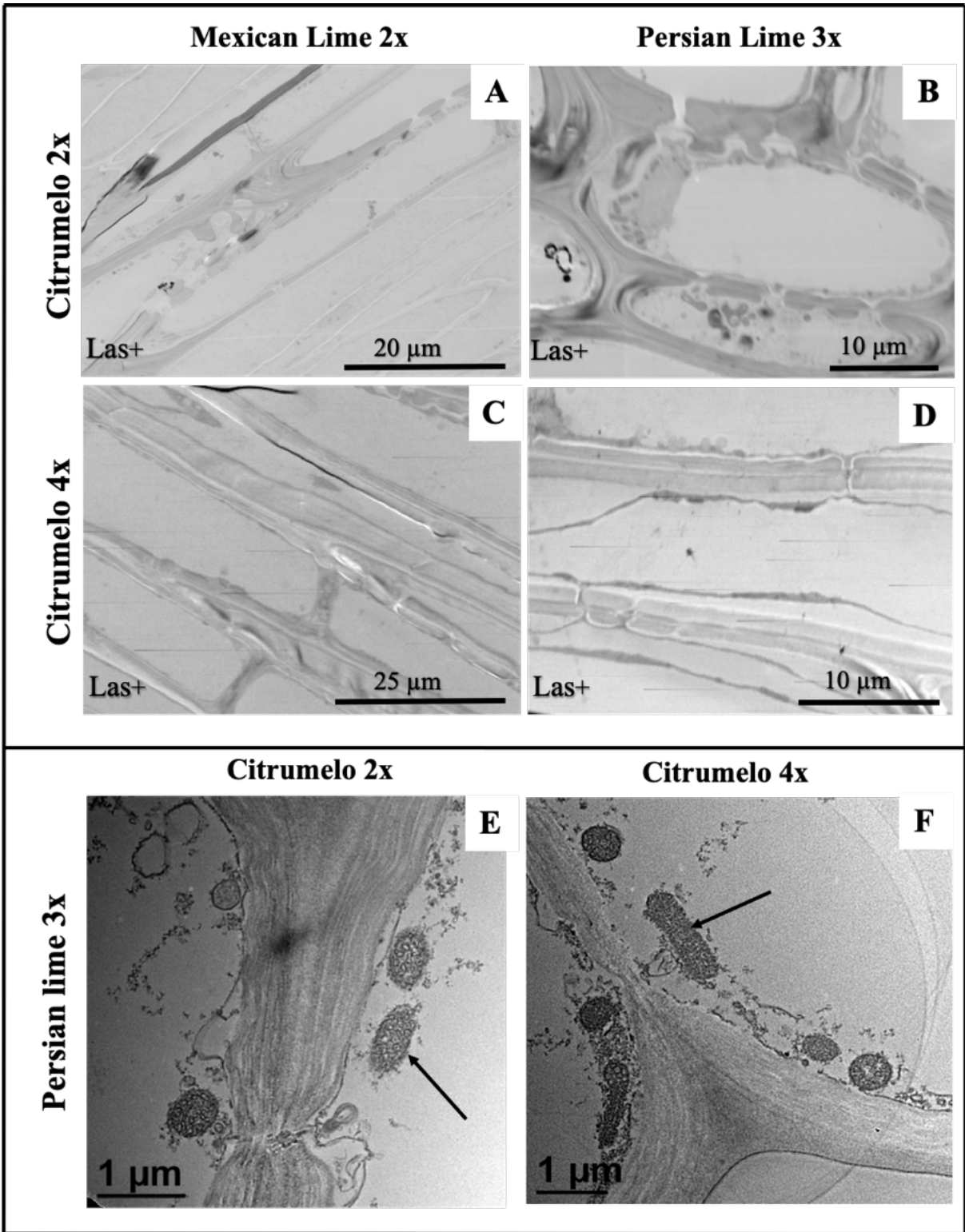
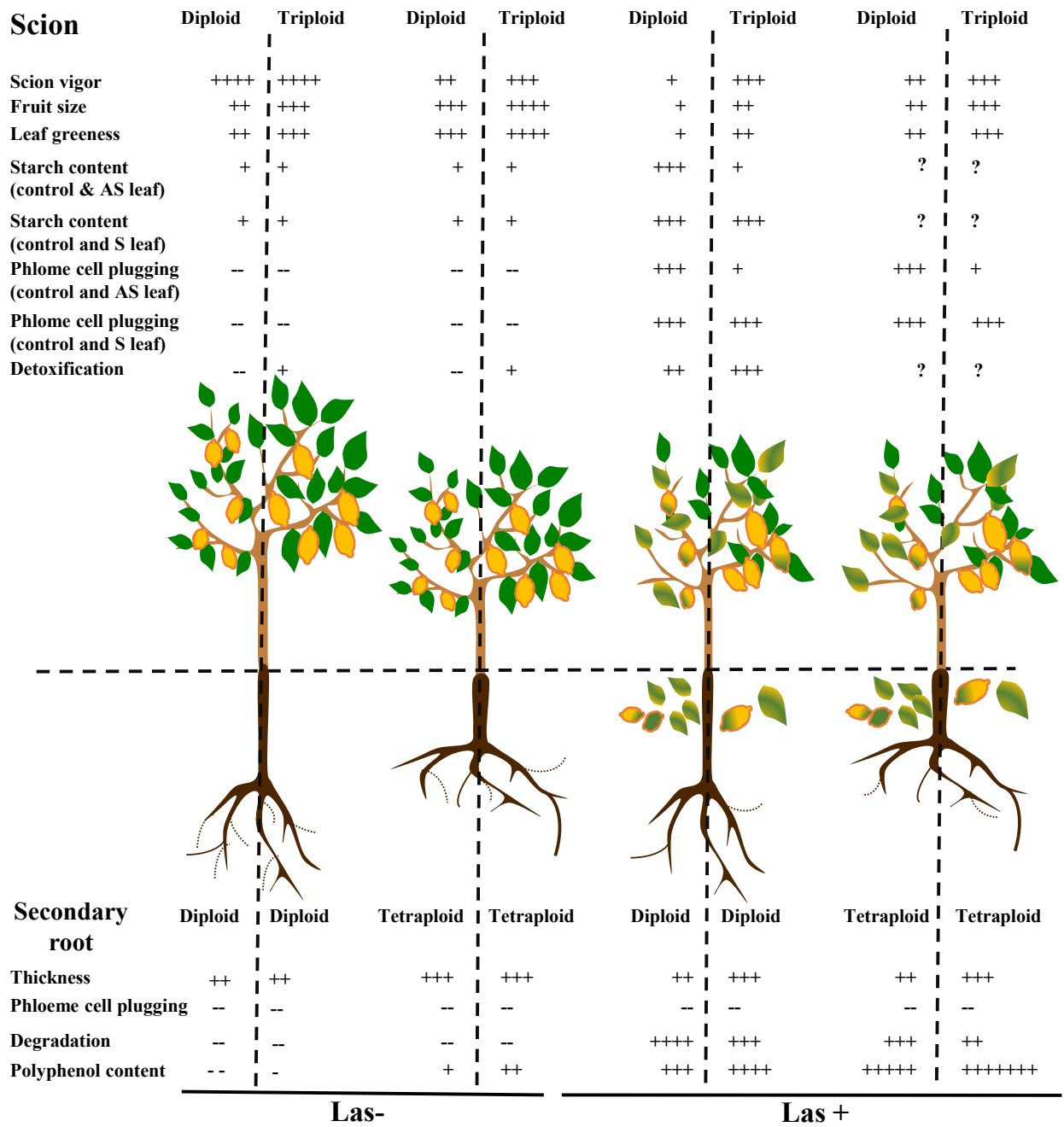


Figure 6. Transmission Electron Microscopy of phloem sieve plate in diploid (2x; A, B) and tetraploid (4x; C, D) roots of Citrumelo grafted with Mexican lime (2x) and Persian lime (3x) infected (Las+) by *Candidatus Liberibacter asiaticus* and visualization of Las (black arrows) in diploid (E) and tetraploid (F) roots of Citrumelo grafted with Persian lime 3x.

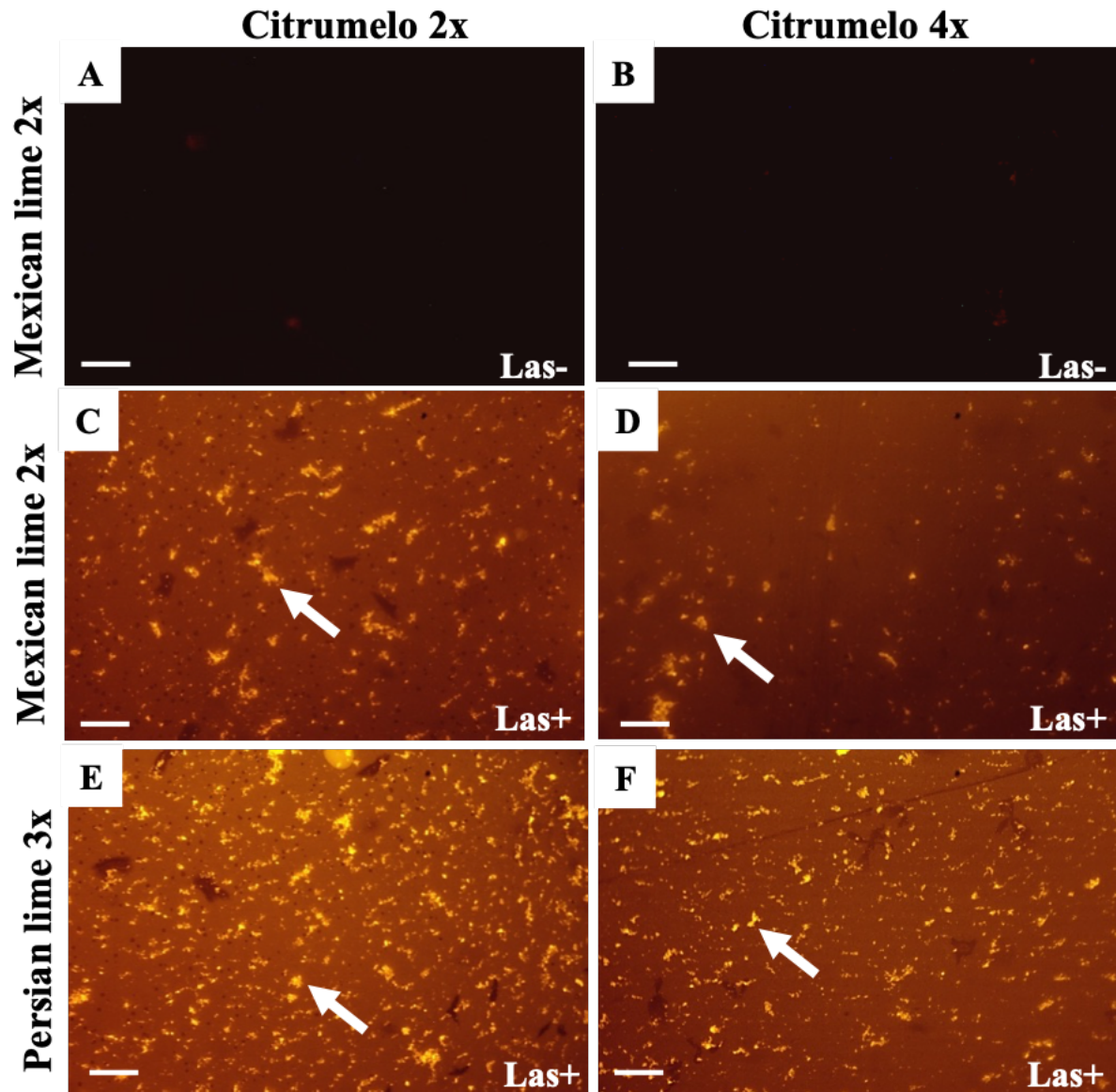


**Figure 7. Impact of poly ploidy at the rootstock and scion levels regarding different phenotypic traits modified by HLB.** Rootstock-scion associations are evaluated in control (Las-) and HLB infected trees (Las+). AS leaf means Asymptomatic leaf and S leaf means Symptomatic leaf. Data in the diploid and triploid scions grafted with diploid rootstock are extracted from Sivager et al., (2021).

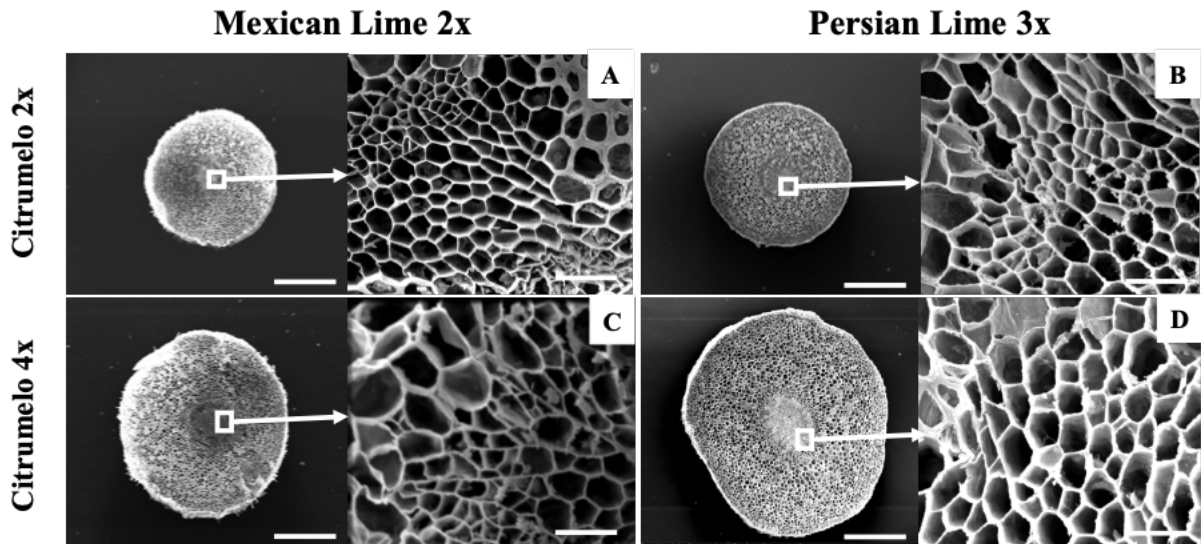


**Supplemental Table 1. Leaf physiological characterization of Mexican and Persian limes. Leaf greenness (SPAD unit), effective quantum yield of PSII ( $\Phi$ PSII) within light-adapted leaves, measured in symptomatic leaf from Mexican and Persian limes, grafted onto 2x and 4x citrumelo rootstocks respectively. Results are expressed as mean  $\pm$ SE (n= 20 measurements). ANOVA tests were performed to determine if HLB led to significant differences. Results with citrumelo 2x are extracted from Sivager et al., (2021)**

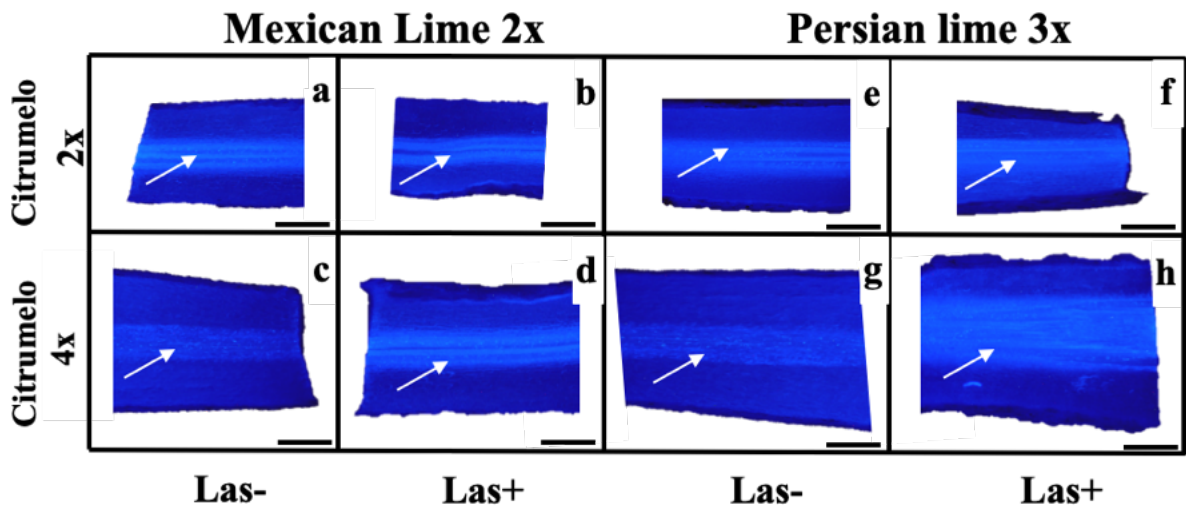
Scion	Mexican lime		Persian lime	
	Citrumelo 2x	Citrumelo 4x	Citrumelo 2x	Citrumelo 4x
SPAD (AU)	41.5 $\pm$ 5.98 a	52.42 $\pm$ 4.6 ab	56.28 $\pm$ 11.94 b	59.13 $\pm$ 9.43 b
QY (AU)	0.36 $\pm$ 0.13 a	0.47 $\pm$ 0.01 b	0.50 $\pm$ 0.13 b	0.59 $\pm$ 0.06 c



Supplemental Figure 1. FISH analysis using a probe targeted against *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) performed by using a same amount of grounded root material of control (Las-; A & B) and infected roots of Citrumelo 4475 2x (C & E) and 4x (D & F) grafted with Mexican (C & D) and Persian limes (E & F) respectively. White arrows indicate the fluorescence resulting from the presence of Las. Bars = 40  $\mu$ m.



Supplemental Figure 2. Transversal SEM of diploid (2x) and tetraploid (4x) roots of Citrumelo Swingle 4475 grafted with 2x or 3x limes uninfected by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las). Bars of the left pictures = 0.5mm, bars of the right images with higher magnification = 5 $\mu$ m.



Supplemental Figure 3. Aniline blue staining on diploid (2x) and tetraploid (4x) roots of Citrumelo 4475 rootstocks grafted with Mexican or Persian lime infected (Las+) or not (Las-) by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Arrows indicate the position of the phloem. Bars = 0.5 mm.

***5. Chapitre 3 : L'expression des génomes des agrumes polyploïdes est-elle à l'origine de leur meilleure tolérance face au HLB par rapport aux diploïdes ?***

## 5.1. Contexte

Dans le cadre du **Chapitre 3** de cette thèse, l'étude a été réalisée sur les différentes associations présentées dans le **Chapitre 2**.

Dans cette partie, nous avons voulu vérifier si l'expression des génomes des polyploïdes apporte un certain avantage par rapport à la maladie du HLB. Pour cela nous avons réalisé des analyses RNAseq. En condition contrôle, il nous est apparu intéressant de vérifier si les polyploïdes exprimaient spécifiquement certains gènes de manière constitutive face au HLB. De plus, il était également important de vérifier si une interaction entre porte-greffe et greffon pouvait être mise en évidence et si chacun des compartiments des plants étudiés pouvait apporter un avantage supplémentaire en fonction de leur niveau de ploïdie.

Il a été démontré depuis plusieurs années que le gène *NPR1* a une importance dans l'accumulation de l'acide salicylique. De ce fait, il nous a paru intéressant de vérifier si des hormones comme SA ou encore JA étaient impliquées dans la meilleure tolérance au stress induit par le HLB et si la polyploïdie et le HLB modulait les concentrations de ces hormones.

## 5.2. Résultats

### 5.2.1. Analyse RNAseq

#### 5.2.1.1. Analyse générale

Après l'extraction des ARN et la réalisation des banques, celles-ci ont été séquencées. Il a été possible d'analyser les gènes différentiellement exprimés (GDE) pour les différents plants en condition témoin versus condition malade.

Le diagramme de Venn pour les feuilles (**Figure 21A**) de plants 2x et 3x a montré que plus le niveau de ploïdie augmentait, plus il y avait une diminution du nombre de GDE. En effet, il est possible d'observer pour la :

- Liste 1 : LT/Cit2x stress vs LT/Cit2x ctrl, 326 GDE
- Liste 2 : LT/Cit2x stress vs LT/Cit2x ctrl, 337 GDE
- Liste 3 : LM/Cit4x stress vs LM/Cit2x ctrl, 144 GDE
- Liste 4 : LM/Cit4x stress vs LM/Cit2x ctrl : 44 GDE.

Pour celui concernant les racines (**figure 21B**), le même schéma est observable avec le compartiment racinaire pour la :

- Liste 1 : 425 GDE
- Liste 2 : 373 GDE
- Liste 3 : 309 GDE

- Liste 4 : 208 GDE.

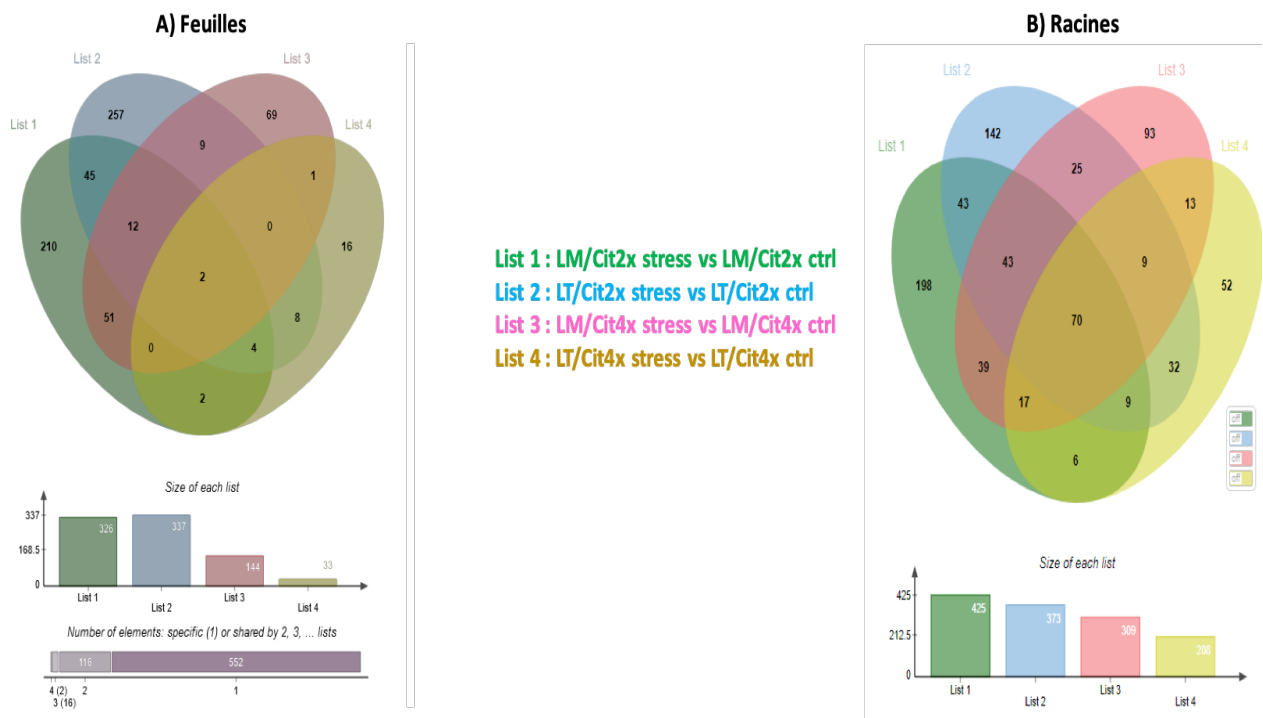


Figure 21 - Diagramme de Venn pour les feuilles (A) de greffons de limettiers 2x et 3x et pour les racines de porte-greffes Citrumelo 2x et 4x

Ces résultats montrent qu'il y a une surexpression ou une sous-expression de certains gènes causés par la maladie du HLB et également un lien avec le niveau ploïdie.

Suite à ces résultats une catégorisation fonctionnelle (**figure 22**) a été faite à partir du logiciel WEGO (<https://wego.genomics.cn/>) et 3 grands groupes ont pu être obtenus :

- Composant cellulaire
- Fonction moléculaire
- Processus biologique.

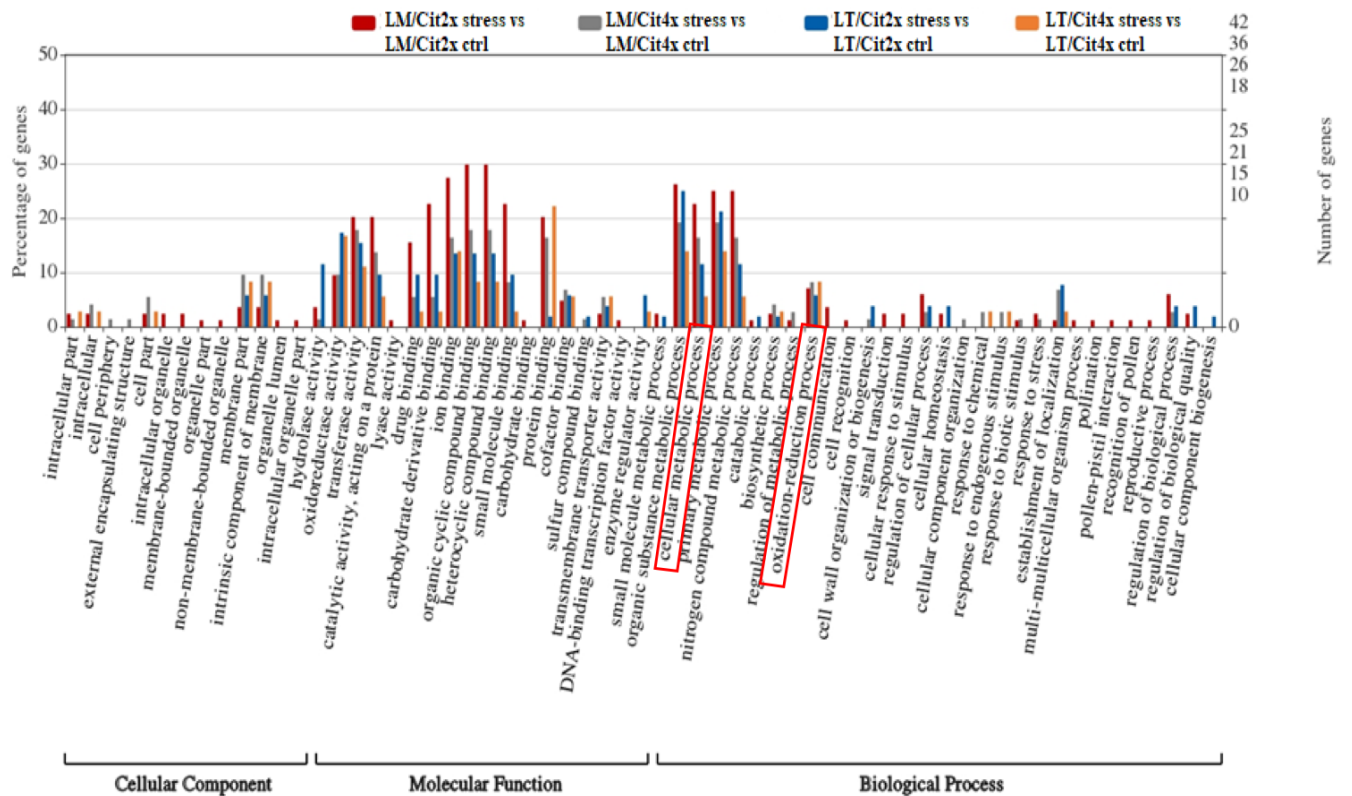


Figure 22 - Catégorisation fonctionnelle de gènes différentiellement exprimés d'une comparaison entre plants infectés ou non par Las

Grâce à cette catégorisation, dans le cadre d'une comparaison témoin/malade, il est possible d'observer des GDE impliqués dans des processus métaboliques cellulaires ou encore dans des processus d'oxydo-réduction.

### 5.2.1.2. Analyse subjective de gènes impliqués dans le développement et la défense des plantes

Les gènes étudiés ont été sélectionnés par rapport aux données obtenues dans les **Chapitre 1** et **Chapitre 2**.

Tableau 2 – Impact du HLB et de la polypléidie sur l'expression de certains gènes intervenant dans le développement et la défense des plantes. L'expression de chaque gène est indépendante et ne signifie pas qu'un même nombre de signes + confère une expression de la même importance. + : présence d'expression de gènes et - : une absence d'expression ; les colonnes grises : les plants infectés (Las+) et les blanches : les plants témoins (Las-) ; les signes noirs : expression chez les plants diploïdes et les signes rouges : expressions chez les plants polypléides.

		F ; Las-		F ; Las+		F ; Las-		F ; Las+		R ; Las-		R ; Las+		R ; Las-		R ; Las+	
		Cit2x		Cit2x		Cit4x		Cit4x		LM		LM		LT		LT	
		LM	LT	LM	LT	LM	LT	LM	LT	Cit2x	Cit4x	Cit2x	Cit4x	Cit2x	Cit4x	Cit2x	Cit4x
<b>HSP20-like chaperones superfamily protein</b>	Ciclev10022300m.g	-	-	+	+	-	+	+	++	++++	++++	-	-	++++	+++	-	-
<b>Ascorbate peroxidase 2</b>	Ciclev10012554m.g	+	+	+	+	+	++	+	++	+++	+++	+	+	++	++	+	+
<b>Auxin-induced in root cultures 1</b>	Ciclev10024106m.g	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	++	+++	+	+
<b>Lipoxygenase 3</b>	Ciclev10024819m.g	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++	++	++	++	+++	++	+++
<b>Cytochrome P450 superfamily</b>	Ciclev10018297m.g	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+	+	+++	+++	-	+
<b>Ethylene-forming enzyme</b>	Ciclev10015965m.g	+	+++	+	+	+	++	+	++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++



		F ; Las-		F ; Las+		F ; Las-		F ; Las+		R ; Las-		R ; Las+		R ; Las-		R ; Las+	
		Cit2x		Cit2x		Cit4x		Cit4x		LM		LM		LT		LT	
		LM	LT	LM	LT	LM	LT	LM	LT	Cit2x	Cit4x	Cit2x	Cit4x	Cit2x	Cit4x	Cit2x	Cit4x
<b>NPR1-like protein 3</b>	Ciclev10031343m.g	+	++	+	+	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>WRKY DNA-binding protein 35</b>	Ciclev10021624m.g	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++
<b>Acclimation of photosynthesis to environment</b>	Ciclev10012434m.g	++	+++	+	++	++	+++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-

La catégorisation fonctionnelle (**figure 22**) montre que certains gènes sont sous ou surexprimés dans les feuilles de greffons 2x ou 3x ainsi que dans les racines de porte-greffes 2x ou 4x et que ces gènes se regroupent par famille.

Dans le tableau 2, certains gènes ayant une importance dans le développement ou encore la défense des plantes ont été sélectionnés. Il est possible d'observer une diminution de l'expression du gène *Ciclev10012554m.g* codant l'ascorbate peroxidase 2 au niveau des racines de porte-greffes de Citrumelo 2x et 4x. En revanche, au niveau des feuilles, l'APX2 semble augmenter et notamment pour l'association LT/Cit4x.

Concernant la HSP20-like protein *Ciclev10022300m.g*, au niveau racinaire et en condition témoin (R ; Las-), pour l'ensemble des associations, l'expression semble importante. En revanche, pour les plants malades (R ; Las+), une diminution considérable de cette protéine est observée suggérant une régulation par la maladie. Au niveau des feuilles 2x et 3x, en condition témoin et pour les plants malades, l'expression est relativement faible. Néanmoins, lorsque le niveau de ploïdie est le plus élevé (LT/Cit4x), cette expression semble plus élevée contrairement au reste des associations.

L'observation de la meilleure expression de certains gènes pour l'association LT/Cit4x (F ; Las+) se répète avec les gènes « ethylene-forming enzyme » *Ciclev10015965m.g*, ou encore l'analogue du gène *NPR1*, « NPR1-like protein 3 » *Ciclev10031343m.g*. De plus, il semble avoir une surexpression de ces gènes pour la variété LT contrairement à la variété LM, peu importe le porte-greffe. Au niveau racinaire, aucune différence n'a pu être mise en évidence pour l'analogue de *NPR1*. En revanche, pour le gène codant l'ethylene-forming enzyme (*Ciclev10015965m.g*), même si aucune différence d'expression n'existe entre racines de porte-greffes 2x et 4x, une sous-expression du gène est observée quand les plants sont infectés par la maladie, ceci en comparaison avec les plants témoins.

Il n'existe aucune expression des gènes « auxin-induced in roots culture 1 » *Ciclev10024106m.g*, et « cytochrome P450 superfamily » *Ciclev10018297m.g*, dans les feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti peu importe la condition. En revanche, une sous-expression est observée lors de l'infection au HLB au niveau des racines de porte-greffes 2x et 4x.

Une expression faible est notée chez les feuilles de limettiers 2x et 3x, concernant la lipoxigenase 3, *Ciclev10024819m.g*. De plus, l'expression de ce gène semble être plus importante chez les racines 4x par rapport aux racines 2x. Néanmoins, en condition Las+, une diminution de l'expression peut être observée dans les deux cas, sans différence significative entre racines 2x et 4x.

Concernant le gène WRKY35 *Ciclev10021624m.g*, bien qu'il semble présenter une faible expression au niveau foliaire, au niveau des racines des porte-greffes, une augmentation de cette expression est observable en présence de Las+ par rapport aux plants témoins. Cependant, aucune différence n'a pu être constatée entre racines de porte-greffes 2x et 4x.

Enfin, pour le gène *Ciclev10012434m.g*, aucune expression n'est notable dans les racines mais pour les feuilles une différence peut être observée entre limettier 2x et 3x, où l'expression est plus forte chez les 3x en conditions témoin. En condition Las+, une diminution de l'expression est observée, mais celle-ci reste plus forte chez les limettiers 3x par rapport aux 2x.

### 5.2.1.3. Création de réseaux de gènes issus des feuilles de limettiers 2x et 3x et des racines de porte-greffes 2x et 4x

Après obtention des différents clusters (portant différents noms de couleur) par analyse R, la création de réseaux de gènes a été faite sur le logiciel Cytoscape® afin d'analyser l'expression des gènes dans des catégories bien précises. Une surexpression ou une sous-expression est représentée par une coloration (p value) jaune à orange en fonction de l'intensité de l'expression en comparant deux conditions bien précises.

Les premiers réseaux de gènes (**figure 24** et **25**) ont été obtenus à l'aide du cluster intitulé Turquoise (**figure 23**).

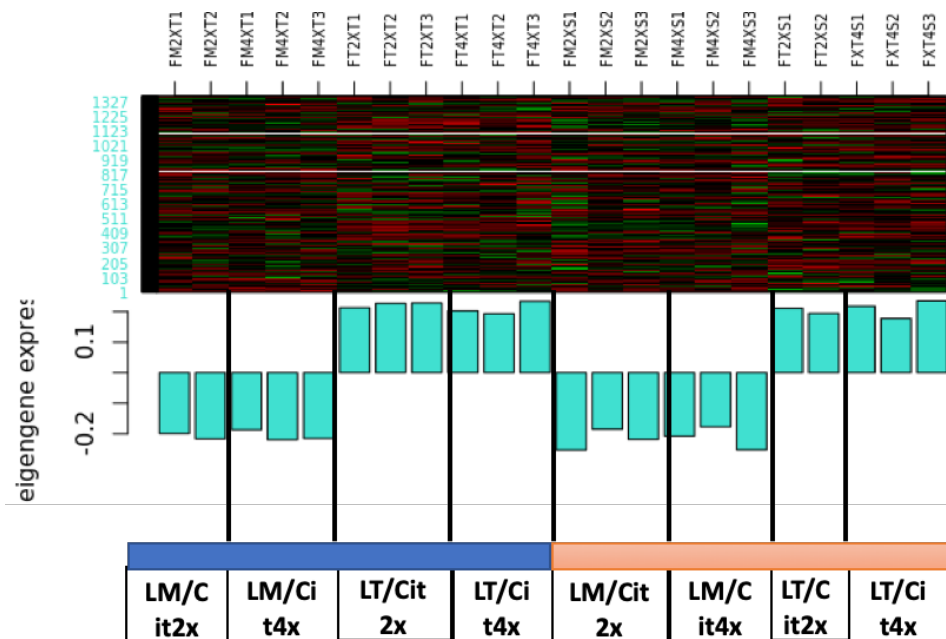


Figure 23 - Cluster "Turquoise" obtenu sous R de feuilles de limettiers 2x et 3x greffés respectivement avec un porte-greffe citrumelo 2x et 4x en condition malade (orange ; Las+) et témoin (bleu ; Las-).

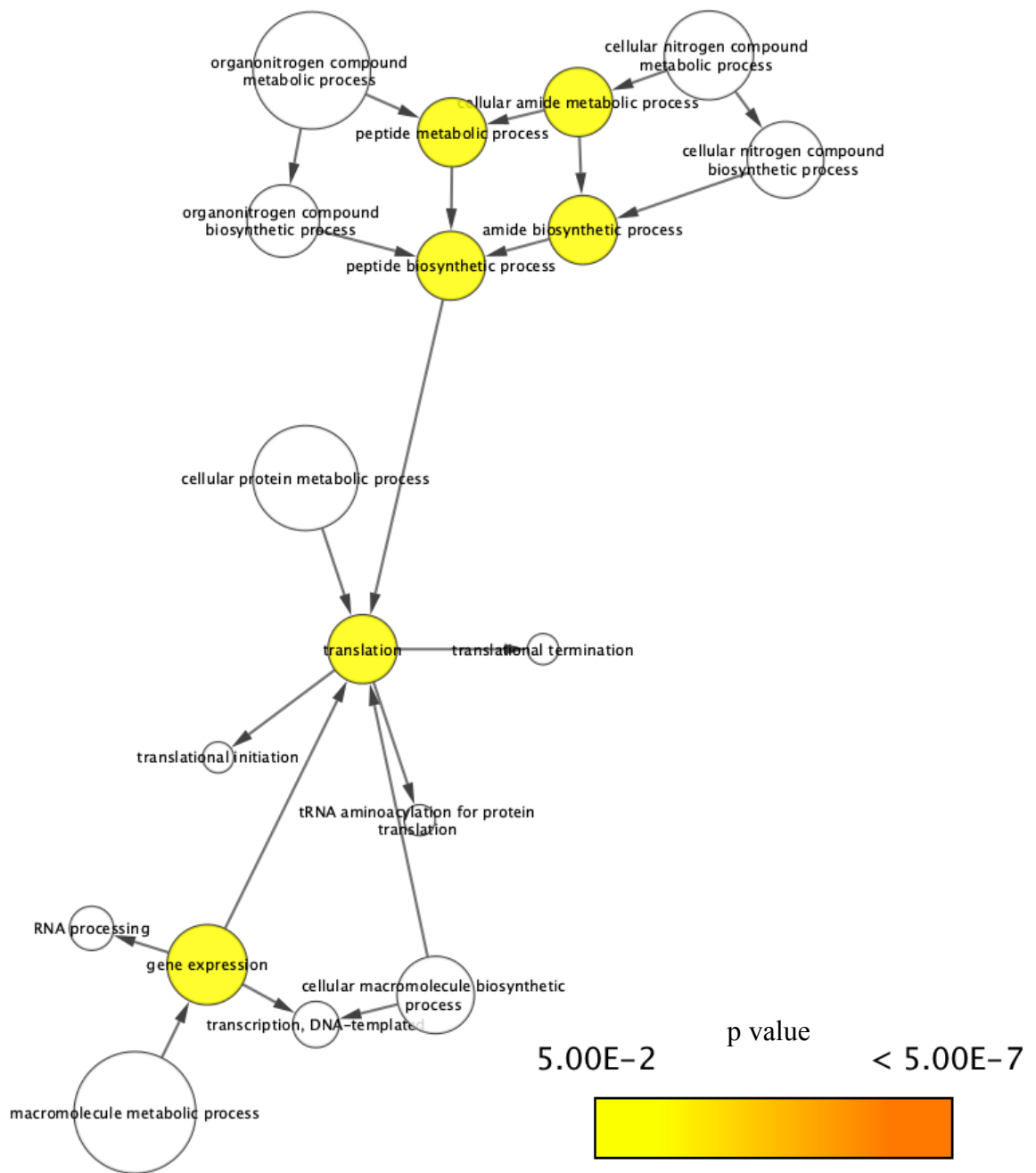


Figure 24 – Réseau de gènes surexprimés après analyse de feuilles de limettier Tahiti greffé avec citrumelo 2x en comparant la condition malade par rapport à celle témoin dans le cluster Turquoise. Les cercles colorés indiquent l'intensité de la surexpression.

Le réseau de gènes de la comparaison LT/Cit2x (Las+) vs LT/Cit2x (Las-) indique qu'il y a une surexpression de gènes pour LT/Cit2x (Las+) par rapport à la condition témoin (**figure 24**). Les catégories où il y a cette surexpression de gènes sont celles appartenant aux processus métabolique, de biosynthèse de peptides ou encore d'amides, la traduction ou encore l'expression des gènes.

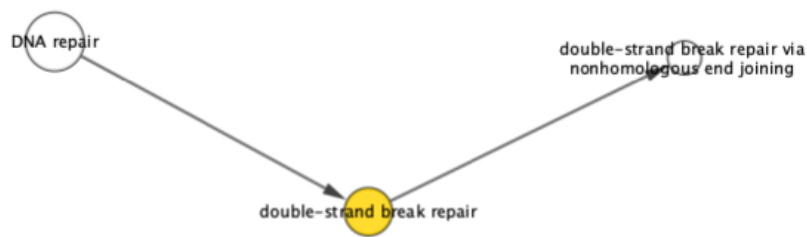


Figure 25 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de feuilles de limettier Mexicain greffé avec citrumelo 4x et citrumelo 2x en condition malade dans le cluster Turquoise. Les cercles colorés indiquent l'intensité de la surexpression.

La **figure 25** montre un réseau de gènes qui compare LM/Cit4x vs LM/Cit2x en condition Las+. Ce réseau indique qu'il y a une surexpression de gènes qui interviennent dans la réparation des cassures double brins dans les feuilles de LM lorsque le porte-greffe associé est un porte-greffe 4x.

Le prochain réseau de gènes a été obtenu en analysant les gènes du cluster Magenta (**figure 26**) sur le logiciel Cytoscape®.

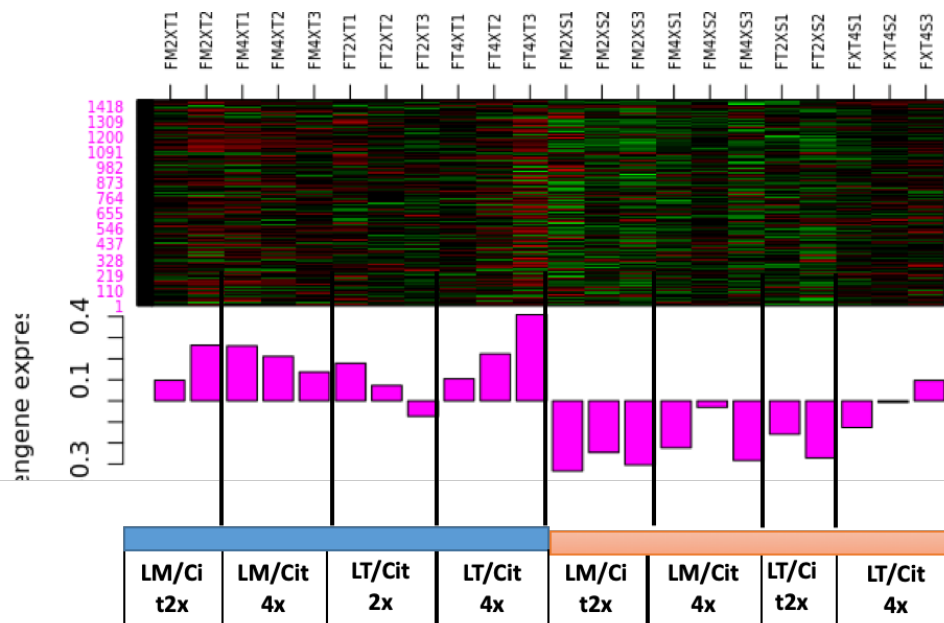


Figure 26 - Cluster "Magenta" obtenu sous R de feuilles de limettiers 2x et 3x greffés respectivement avec un porte-greffe citrumelo 2x et 4x en condition infecté (orange ; Las+) et témoin (bleu ; Las-).

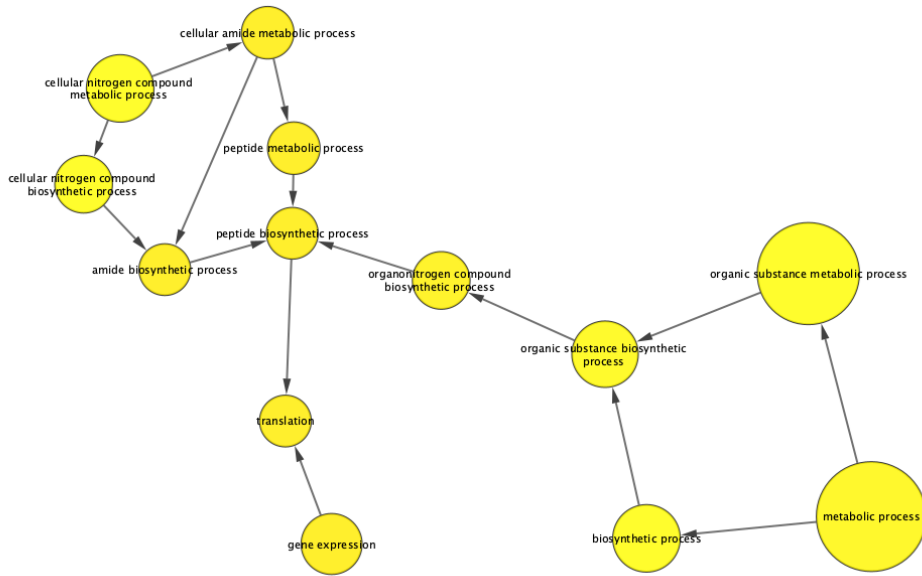


Figure 27 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de feuilles de limettier Tahiti greffé avec citrumelo 2x en comparant la condition infecté par rapport à celle témoin dans le cluster Magenta. Les cercles colorés indiquent l'intensité de la surexpression

Dans le cluster Magenta, tout comme dans la **figure 26**, il y a une surexpression de gènes pour la variété LT/Cit2x en condition Las+ par rapport à celle témoin (**figure 27**). De plus, même s'il semble y avoir plus de catégories de gènes surexprimés, globalement ces catégories sont les mêmes.

Au niveau des racines de porte-greffes, différents réseaux de gènes ont pu être obtenus dans le cluster Brown (**figure 28**).

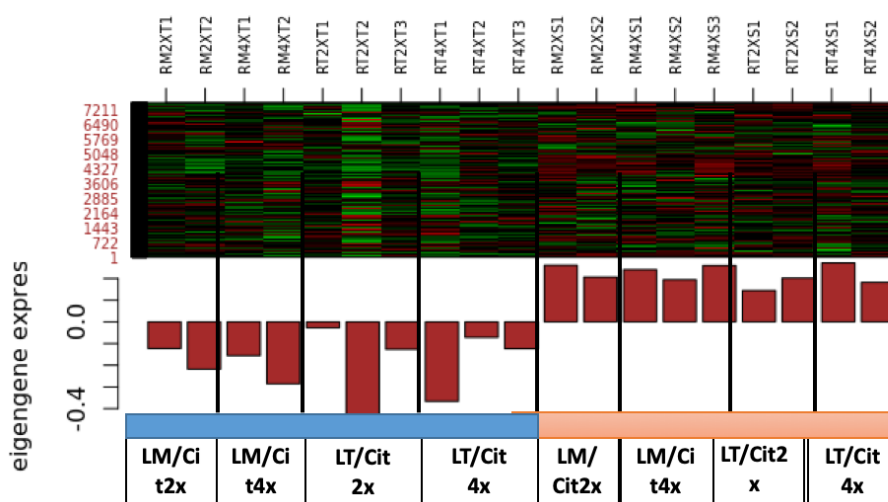


Figure 28 - Cluster "Brown" obtenu sous R de racines de porte-greffes 2x et 4x greffés respectivement avec des limettiers 2x et 3x en condition malade (orange ; Las+) et témoin (bleu ; Las-).

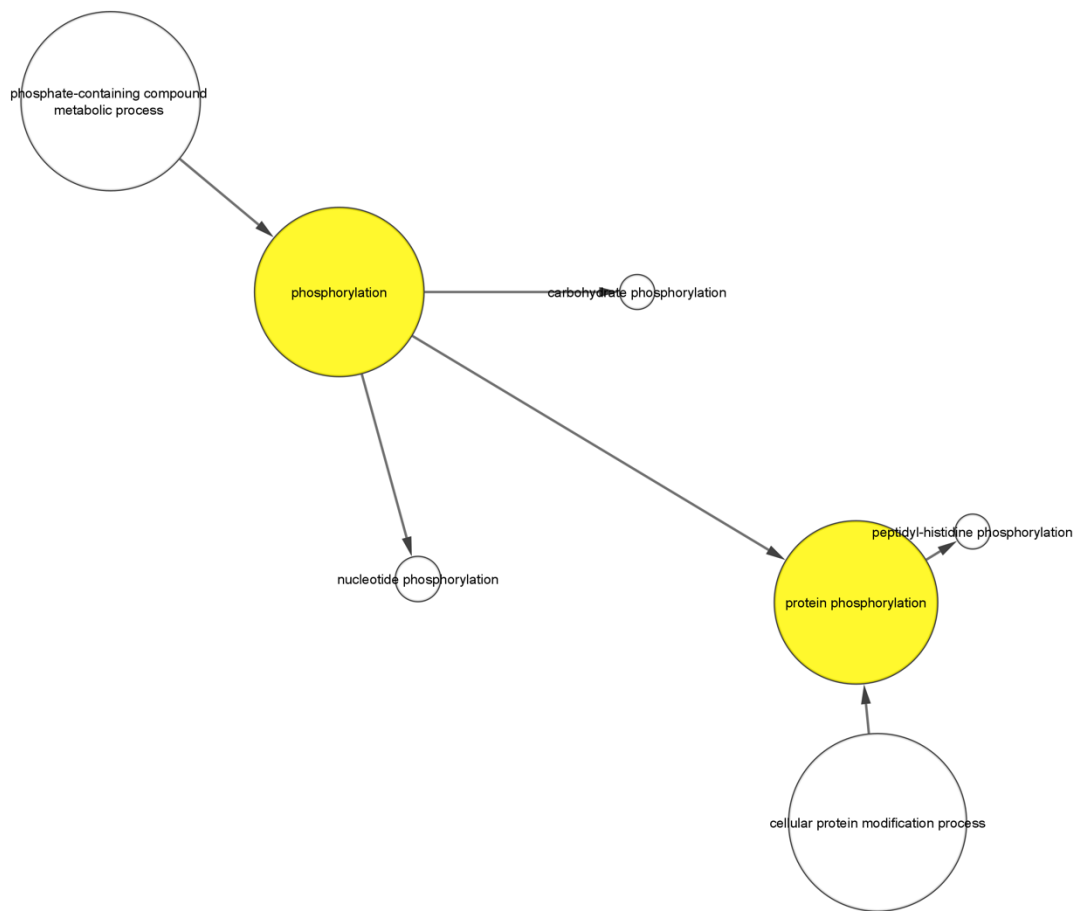


Figure 29 - Réseau de gènes sous-exprimés après analyse de racines de porte-greffe citrumelo 2x greffé avec LT 3x et LM 2x en comparant la condition infecté dans le cluster Brown. Les cercles colorés indiquent sur l'intensité de la sous-expression.

Sur la **figure 29**, il est mis en évidence une sous-expression de gènes impliqués dans la phosphorylation des protéines dans les racines de porte-greffes greffés à la variété 3x par rapport aux racines de porte-greffes 2x greffés à la variété 2x. Néanmoins, d'autres comparaisons ont montré une surexpression de gènes impliqués dans la phosphorylation de protéines (voir **annexes 1, 2 et 3**) pour :

- LT/Cit2x par rapport LM/Cit2x en condition témoin
- LT/Cit4x par rapport LM/Cit4x en condition témoin
- LM/Cit4x par rapport LM/Cit2x en condition témoin

De plus, tout comme pour la partie foliaire où il y a une surexpression de gènes impliqués dans la biosynthèse de peptide, une surexpression est retrouvée dans les racines de porte-greffes 2x greffés avec LT comparé aux racines 2x lorsque le greffon est LM en condition Las+ (**figure 30**).

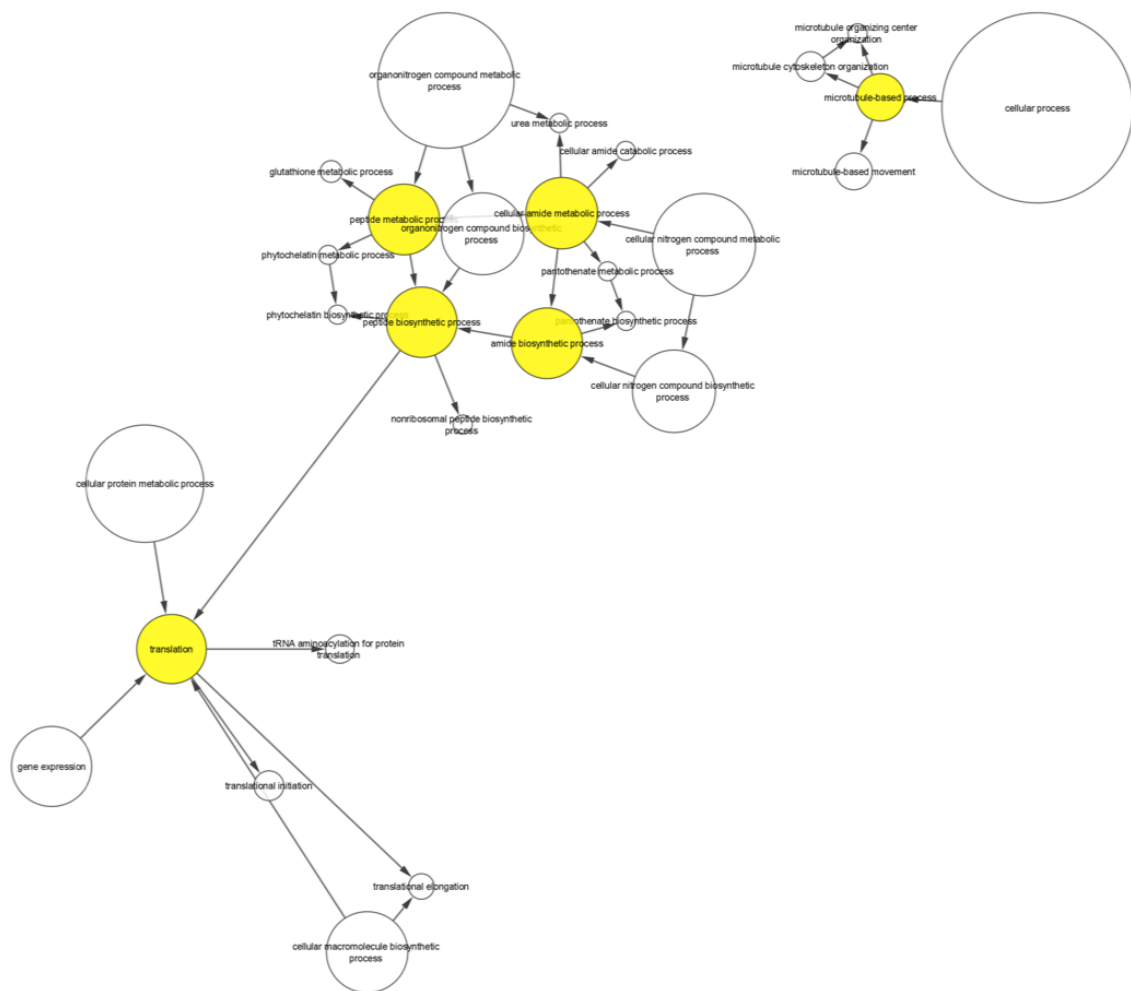


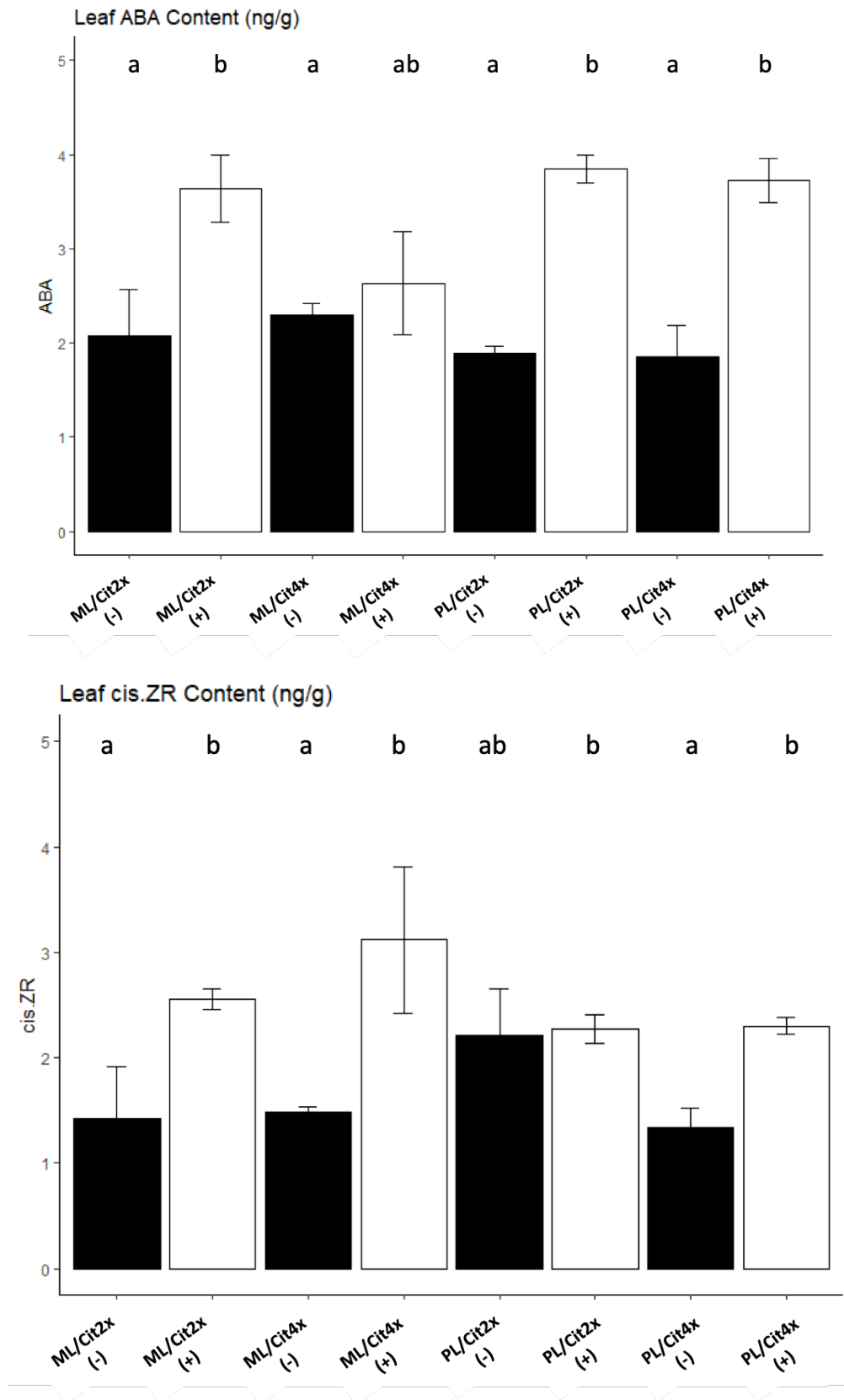
Figure 30 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de racines de porte-greffe citrumelo 2x greffé avec LT 3x et LM 2x en comparant la condition dans le cluster Brown. Les cercles colorés indiquent l'intensité de la surexpression.

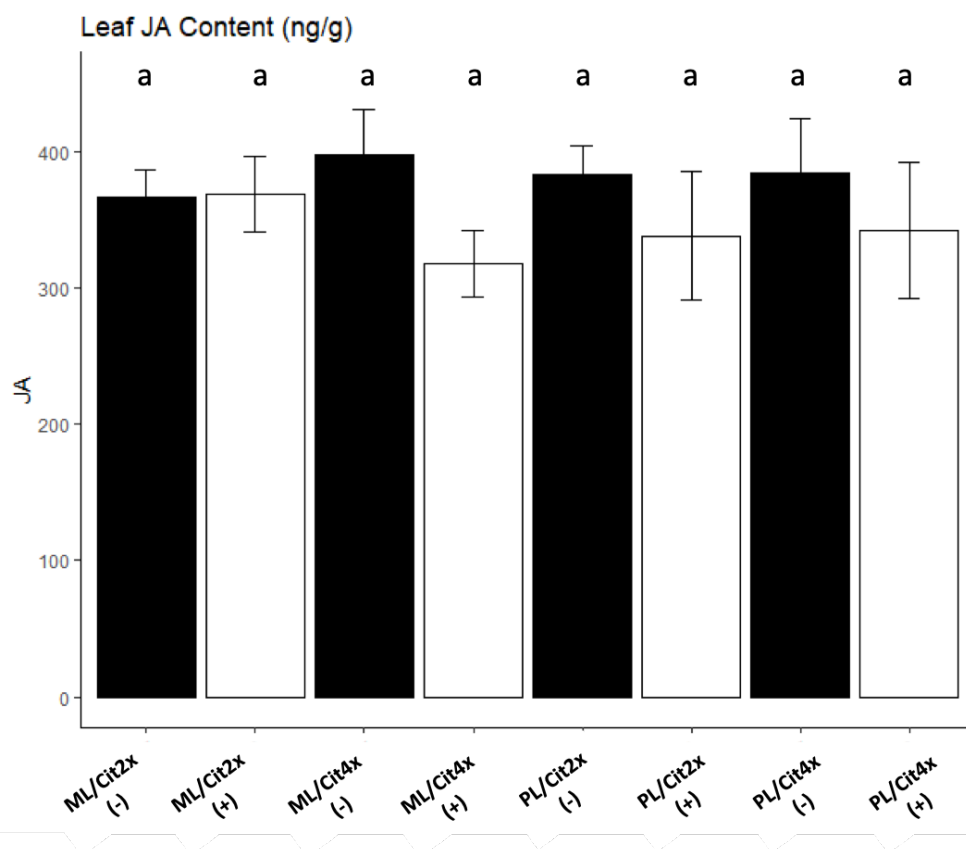
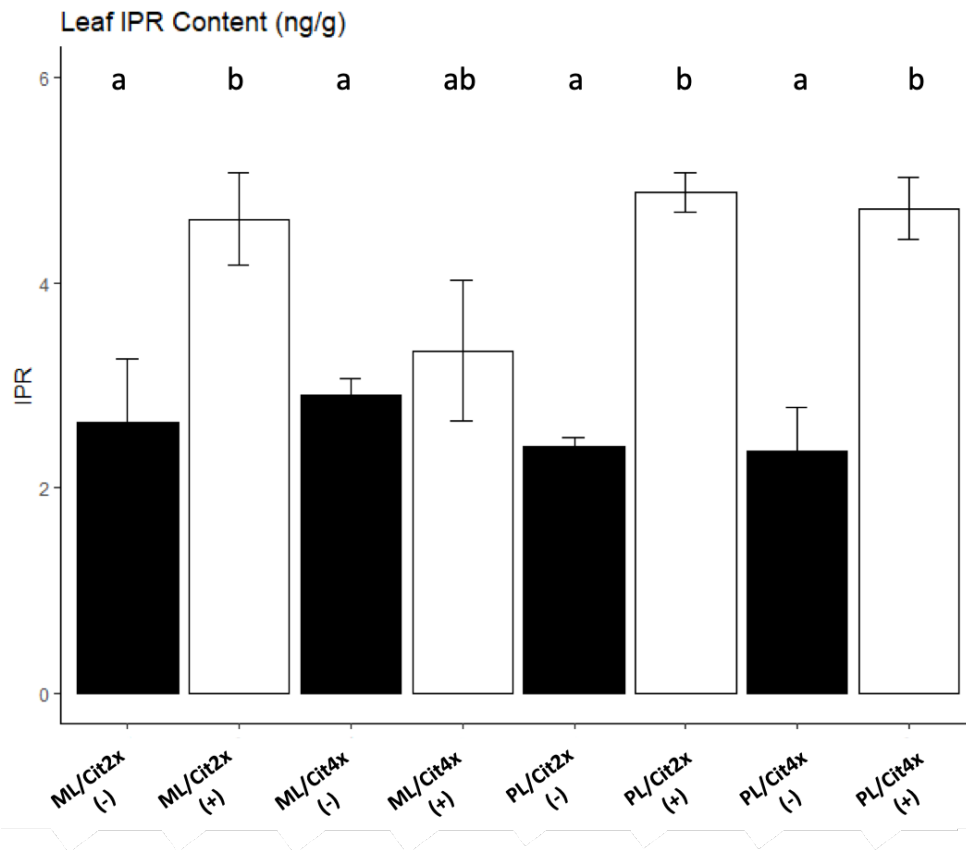
### 5.2.2. Résultats des dosages hormonaux

Les hormones dosées dans les feuilles et les racines étaient les suivantes : ABA (acide abscissique), cis-ZR (cis zeatine-ribose), IPR (adenine-riboside), JA (acide jasmonique) et SA (acide salicylique).



**5.2.2.1. Résultats de dosage de phytohormones au niveau des greffons de limettiers diploïdes et triploïdes**





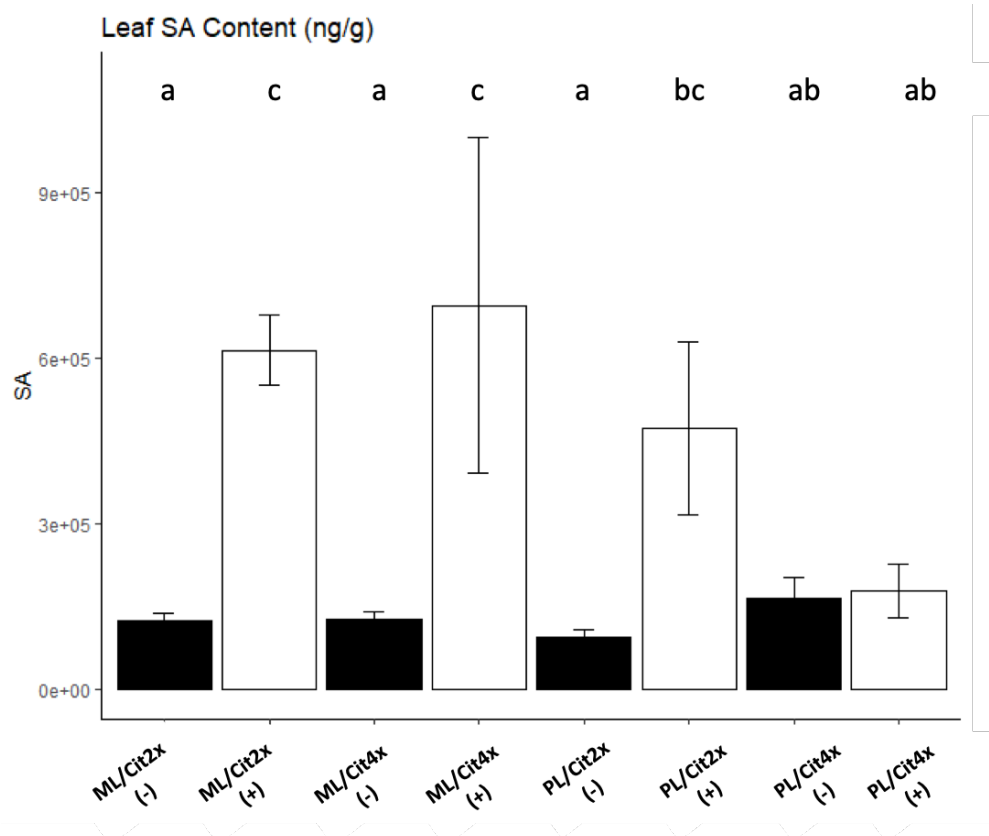
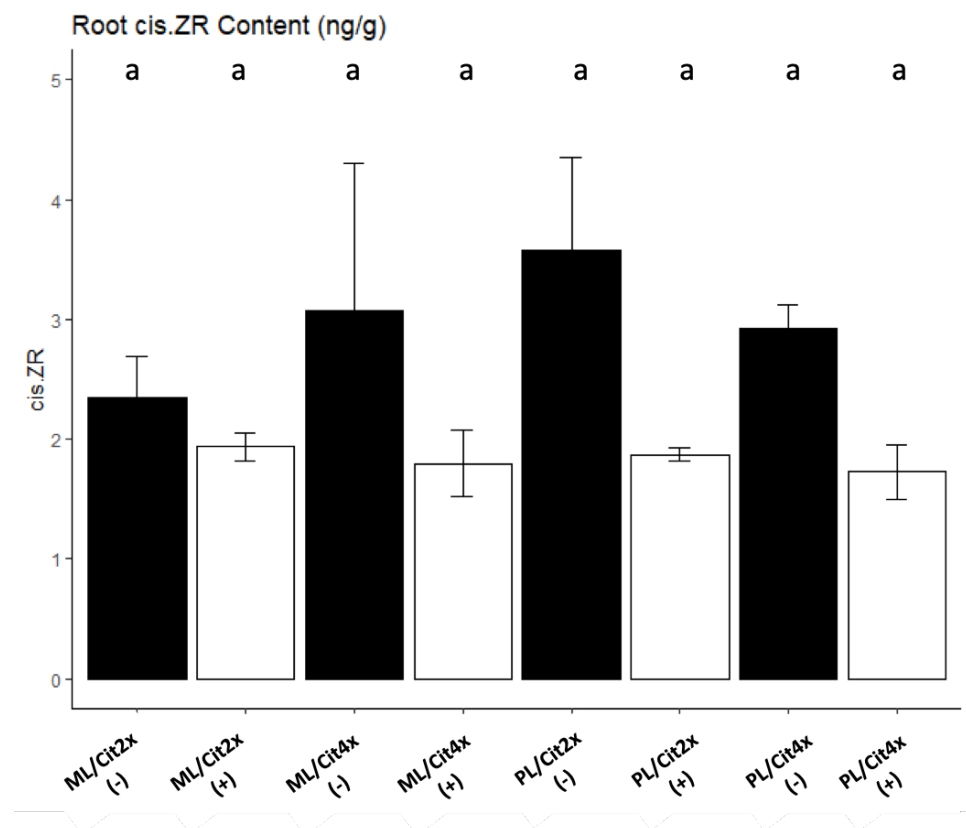
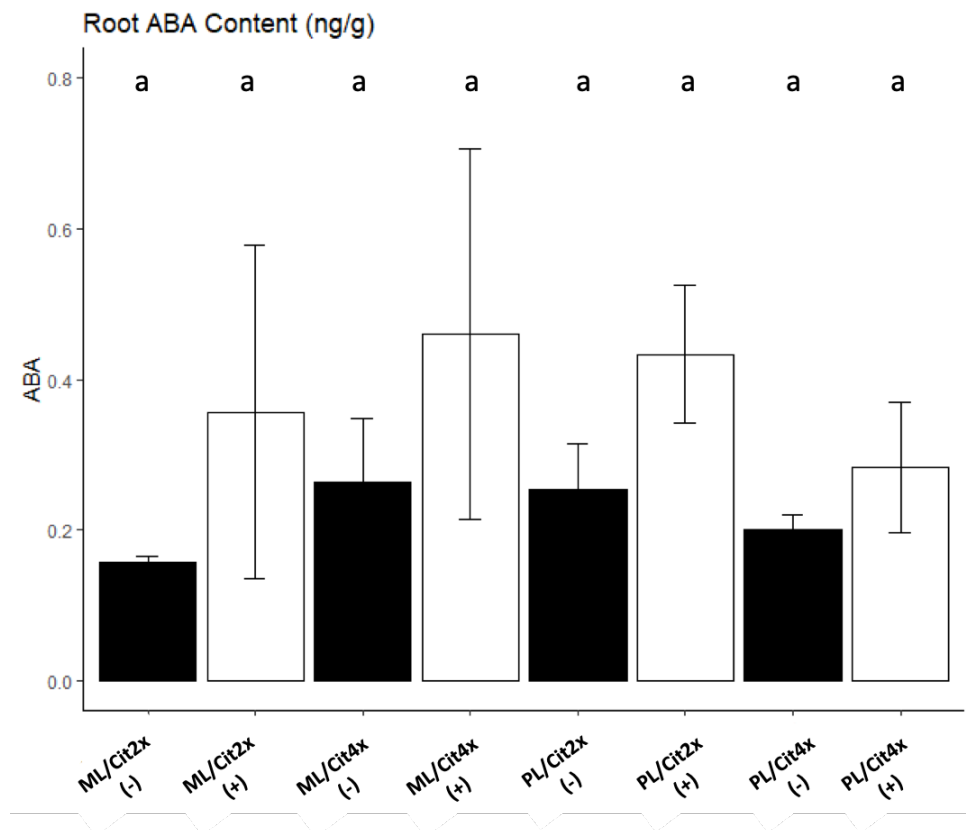
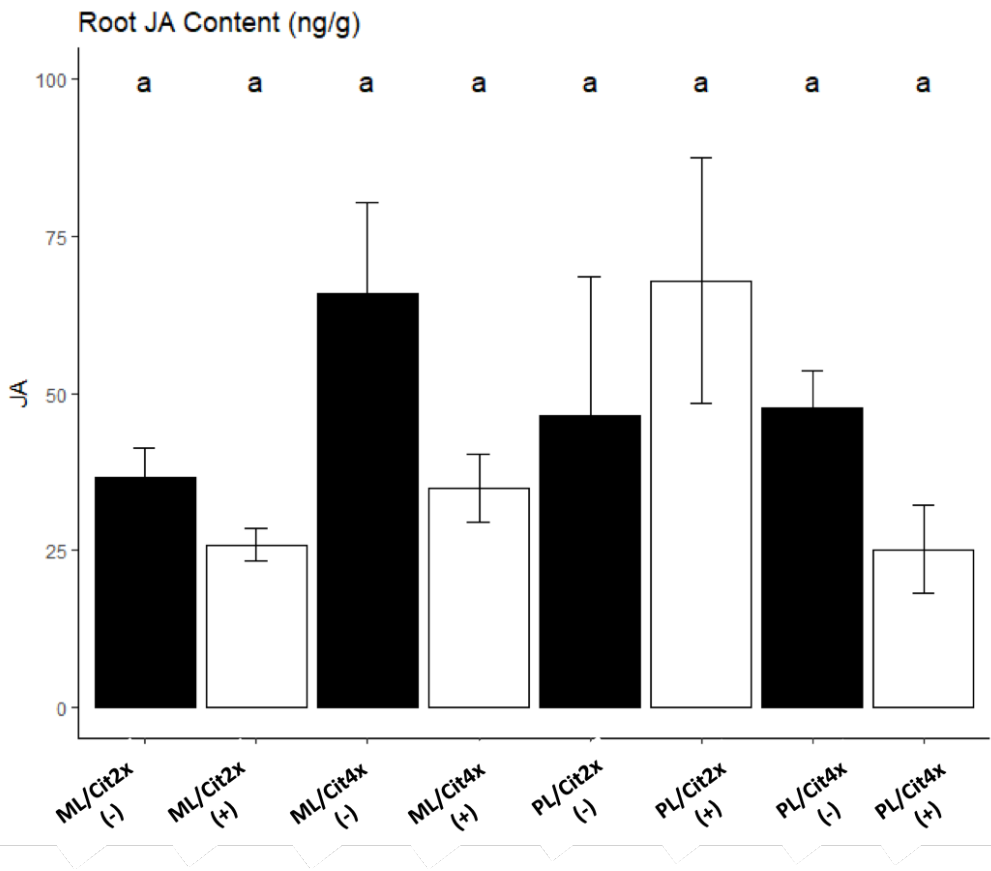
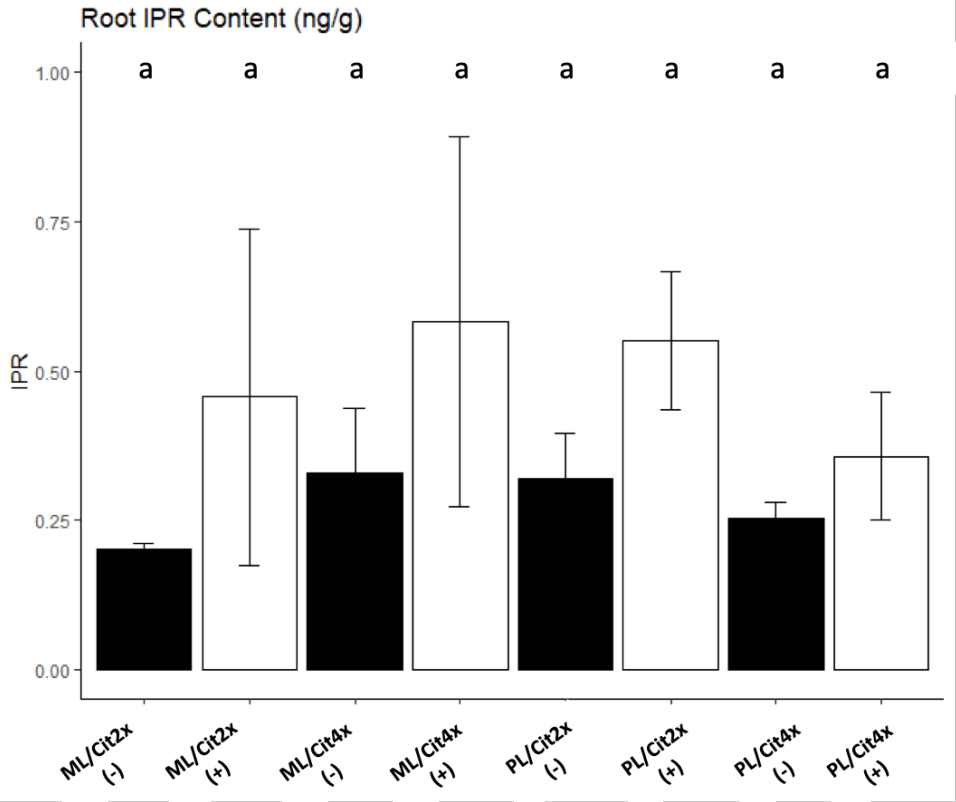


Figure 31 - Dosages des hormones ABA, Cis.ZR, IPR, JA et SA dans les feuilles de limettiers Mexicain 2x et Tahiti 3x HLB+ ou HLB- greffés respectivement avec des porte-greffes Citrumelo 2x et 4x.

Les dosages de l'ABA dans les feuilles 2x et 3x ont montré qu'il y avait le plus souvent une augmentation de la quantité de cette hormone pour les plants infectés. Cette observation peut également être faite pour le Cis.ZR et de l'IPR. Toutefois, aucune différence significative n'a été faite entre les 2x et 3x. Dans le cas de l'acide jasmonique (JA), aucune différence significative n'a pu être observée. Les résultats concernant l'acide salicylique (SA) ont montré une augmentation considérable lors de l'infection au HLB (**figure 31**).

#### 5.2.2.2. Résultats des dosages de phytohormones au niveau des racines de porte-greffes diploïdes et tétraploïdes





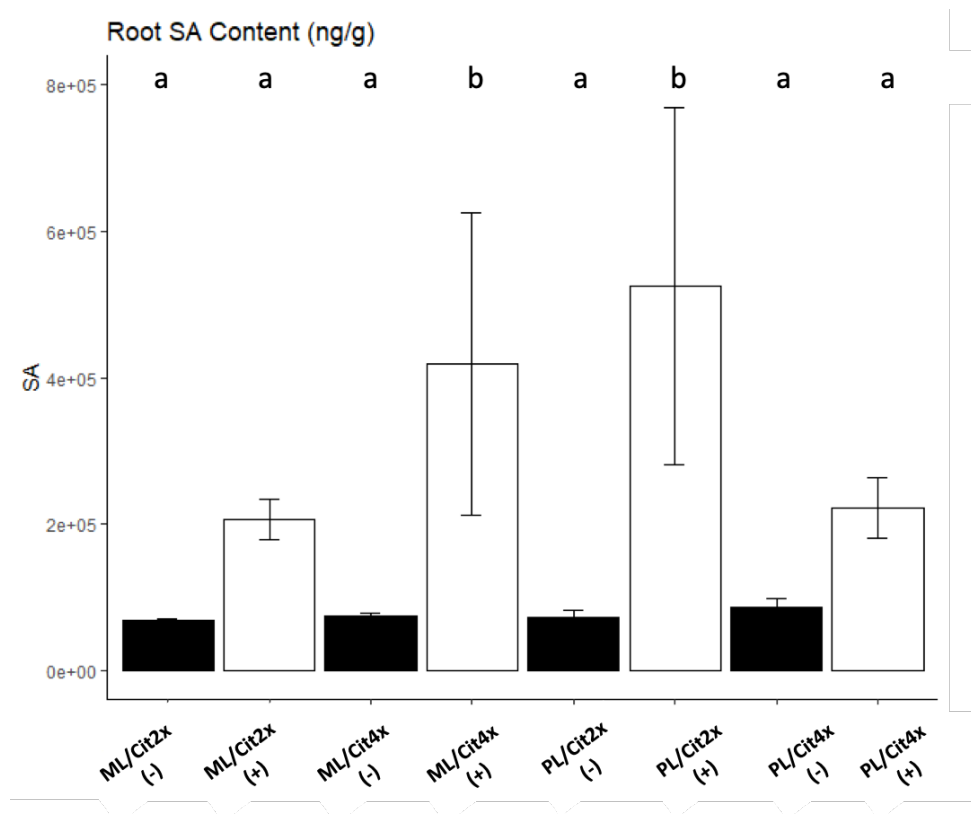


Figure 32 - Dosages des hormones ABA, Cis.ZR, IPR, JA et SA dans les racines de porte-greffes Citrumelo 2x et 4x greffés respectivement avec des limettiers Mexicain 2x et Tahiti 3x HLB+ et HLB-.

Pour l'ensemble des hormones dosées dans les racines (**figure 32**), à l'exception de SA, aucune différence significative n'a pu être observée entre les différentes associations greffons/porte-greffes. Concernant l'acide salicylique, une nette augmentation est observable dans les racines des plants infectés par la bactérie responsable du HLB par rapport aux données observées chez les plants témoins.

### 5.2.3. Résultats du métabolome

Les analyses du métabolome ont été réalisées par le plateau technique de Bordeaux. Les résultats préliminaires de ces analyses du métabolome concernent uniquement les greffons 2x et 3x greffés avec des porte-greffes 2x et 4x. A ce jour, les résultats racinaires n'ont pas encore été obtenus.

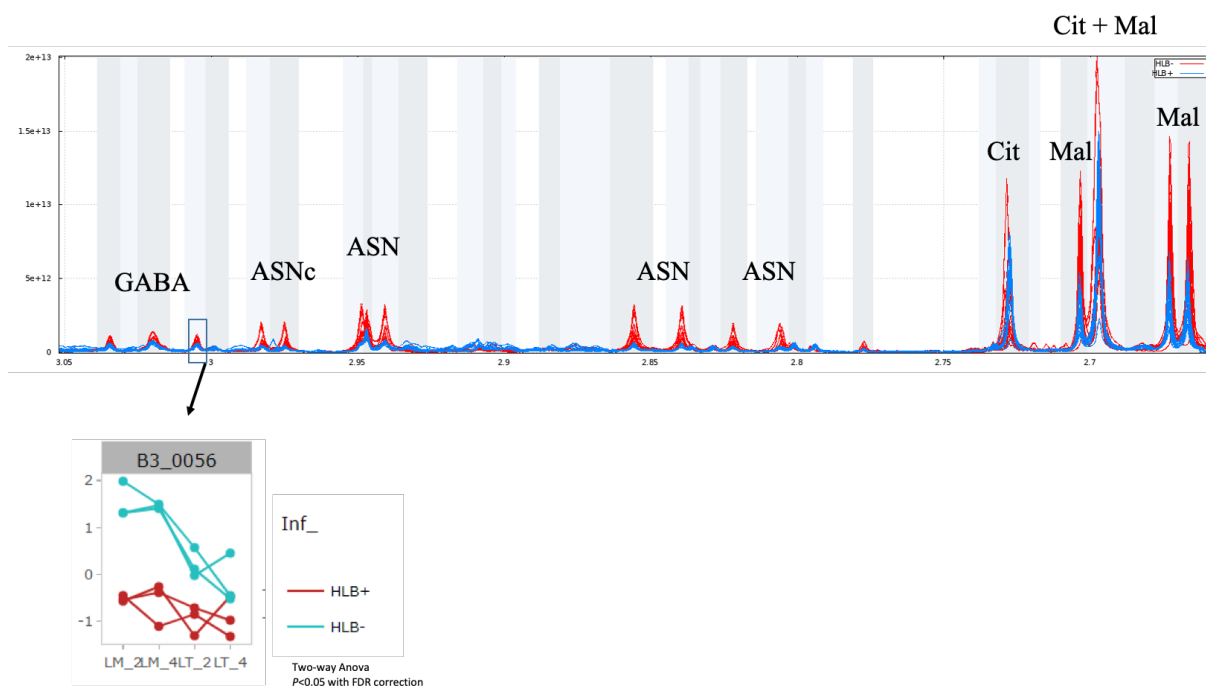


Figure 33 - Spectre visuel de feuilles de greffons infectés (courbe bleue) ou non (courbe rouge) par le HLB. Couleur inversée dans le graphe pour GABA.

La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) a révélé qu'il y avait une chute de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) dans les feuilles de plants infectés par le HLB contrairement à ceux témoins. De plus, l'observation du spectre de l'asparagine (ASN) semble indiquer une diminution de ce métabolite chez les plants infectés.

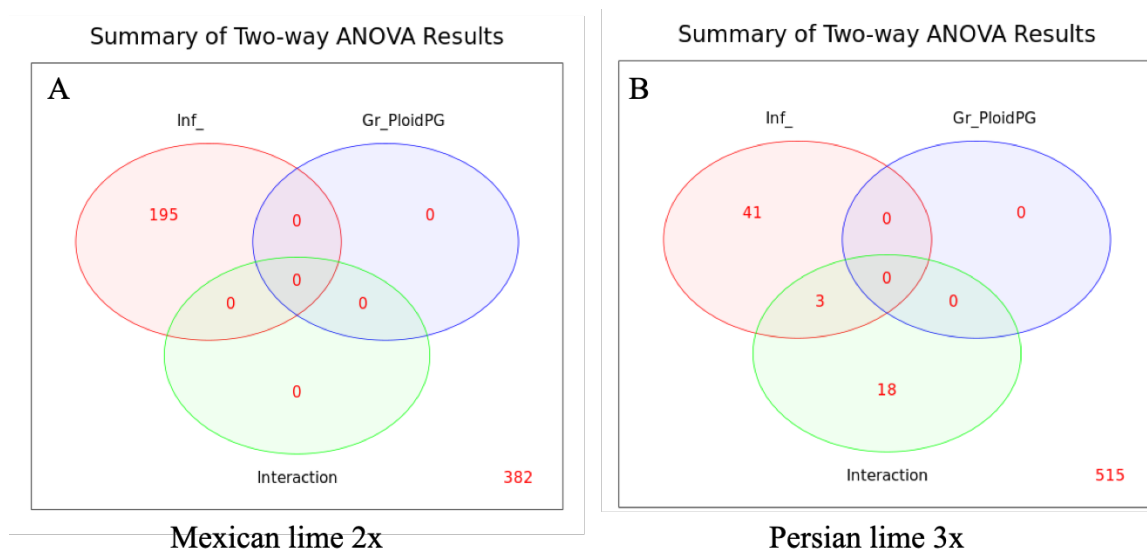


Figure 34 - Résumé des résultats du métabolome greffons 2x (A) et 3x (B) en fonction de l'infection à la maladie (rouge), l'interaction greffon/porte-greffe (vert) et de la ploïdie du porte-greffe (bleu).

Les résultats de l'ensemble de l'analyse du métabolome pour le greffon 2x indiquent qu'il y a un effet dû à l'infection sur 195 variables et aucun dû à la ploïdie du porte-greffe ou encore à l'interaction. En revanche, les résultats pour le greffon 3x montrent qu'il y a un effet de l'infection sur uniquement 44 variables mais aussi un effet dû à l'interaction sur 21 variables (**figure 34**).

### 5.3. Discussion

Le but principal de ce **Chapitre 3** était de vérifier si l'expression du génome des polyploïdes pouvait être à l'origine d'une meilleure tolérance face à la maladie du HLB. Il est connu dans la littérature que différents gènes (Wang et al., 2016) sont impliqués dans la meilleure tolérance au HLB. Les premiers résultats obtenus par RNAseq ont permis d'indiquer qu'il y avait bien des gènes différentiellement exprimés suite à l'infection par Las. Le diagramme de Venn a révélé un certain nombre de GDE lors de la comparaison entre les témoins et les plants infectés. La catégorisation fonctionnelle a permis de mettre en évidence les catégories dans lesquelles les GDE étaient associés. Différentes catégories ont pu être identifiées comme les gènes impliqués dans les « activités d'oxydoréductase » mais aussi les « processus métaboliques cellulaires » ou encore les « liaisons d'ions » ou « de protéines ». Il a été démontré, chez les agrumes, que la polyploïdie apportait un avantage concernant le stress oxydatif induit par les différents stress biotiques (Allario et al., 2013; Khalid et al., 2020; Lourkisti et al., 2021, 2021 (1); Oustric et al., 2017, 2019) qu'ils soient de franc pieds ou greffés avec un porte-greffe. Ainsi, avec la catégorisation fonctionnelle (**figure 22**) il est possible d'observer l'association qui semble présenter le plus de GDE est celle présentant le niveau de ploïdie le plus bas, LM/Cit2x. Ces résultats seraient en accord avec le diagramme de Venn qui montre un nombre de GDE plus élevé pour LM/Cit2x, variété comme on l'a vu fortement sensible au HLB (*cf. Chapitre 1* : Sivager et al., 2021). De plus, ce diagramme semble indiquer un impact de la polyploïdie où plus le niveau de ploïdie augmente, plus le nombre de GDE semble diminuer sûrement caractéristique du plus faible impact de la maladie chez les polyploïdes. D'autres gènes impliqués dans l'élimination des ROS, caractéristique du stress oxydatif induits par le HLB, ont montré l'importance de la polyploïdie où l'association avec le niveau de ploïdie le plus élevé montré une surexpression de ceux-ci (**tableau 2**). Impliqué dans la réponse au stress, l'APX est une enzyme capable de réduire, à l'aide du co-substrat AsA, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O, limitant ainsi l'impact toxique de cette molécule (Caverzan et al., 2012). Dans le tableau récapitulatif des gènes exprimés, il est indiqué que l'association LT/Cit4x se comportait mieux que LM/Cit4x en condition témoin et en condition Las+, schéma que l'on



pouvait retrouver dans le **Chapitre 1** quand le dosage de l'APX a été réalisé pour les mêmes variétés mais greffés avec un porte-greffe 2x. Le **Chapitre 2**, qui faisait l'objet d'une analyse plus générale du pouvoir antioxydant, montrait également une défense antioxydante plus efficace pour les polyploïdes contrairement aux 2x. Une autre corrélation mise en évidence entre le premier chapitre et celui-ci est celle pour le gène impliqué dans la photosynthèse, *Ciclev10012434*. En effet, à cause du blocage des pores du phloème, les produits photosynthétiques ne sont pas transloqués créant des marbrures asymétriques et réduisant ainsi la photosynthèse. Les résultats de l'expression de ce gène montrent bien une expression plus grande pour les polyploïdes en condition témoin et en condition malade. De plus, l'impact de la maladie est également observable avec une baisse de l'expression de ce gène en condition Las+, ce qui avait pu être observé dans le 1<sup>er</sup> Chapitre avec les résultats des analyses physiologiques (photosynthèse, transpiration...). Ainsi, malgré une baisse de l'expression de ce gène, la variété 3x qui présente une meilleure activité photosynthétique serait en mesure de continuer à alimenter le reste de la plante avec les produits photosynthétiques nécessaires.

Le gène ethylene-forming enzyme (EFE) est impliqué dans la catalyse de la dernière étape de biosynthèse de l'éthylène (Hamilton et al., 1991) qui est une hormone végétale intervenant dans le développement mais aussi la défense des plantes contre les différents stress abiotiques et biotiques incluant également l'attaque des pathogènes (Eckert et al., 2014). Nos données ont montré qu'au niveau foliaire il y avait généralement une différence d'expression entre les deux variétés. En effet, l'expression du gène impliqué dans la synthèse de l'EFE était généralement plus importante chez la variété 3x contrairement à la variété 2x, conférant ainsi une meilleure tolérance face aux stress. Bien qu'il semble y avoir une diminution de l'expression en condition Las+ pour la variété 3x associé à un porte-greffe 2x, ceci n'était pas observable lorsque le porte-greffe associé était 4x, conférant certainement une tolérance supplémentaire. En revanche, au niveau racinaire une diminution de l'expression de l'EFE était observable dès que les plants étaient infectés. Néanmoins, le fait qu'il y ait une expression en condition infecté pourrait être expliqué par le fait que certains microbes associés aux plantes sont capables de produire également de l'éthylène (Eckert et al., 2014; Weingart et al., 2007) et les données obtenues dans le 2<sup>ème</sup> Chapitre ont montré que les plants infectés montrent au niveau racinaire la présence de beaucoup de bactéries. L'expression de EFE serait donc peut-être due à certains microbes et non aux racines de la plante sachant qu'une forte dégradation de celles-ci est observée par rapport à la forte présence de bactéries dans les racines. De plus l'observation du gène impliqué dans le développement des racines, *Ciclev10024106m.g*, montre une sous-expression de ce gène en condition malade par rapport l'expression dans les racines de plants témoins. En effet,

une dégradation et un affaissement cellulaire étaient observés chez les racines de porte-greffe dans le 2<sup>ème</sup> chapitre.

Enfin, l'importance de la résistance systémique acquise (SAR) a montré que le gène *NPR1* permettait l'accumulation de SA (Durrant & Dong, 2004) et aussi à activer des facteurs de transcription WRKY. Dans nos données, le facteur de transcription WRKY DNA-binding protein 35, avait une expression élevée en condition Las+ dans les racines de porte-greffes 2x et 4x, peu importe le greffon associé. Néanmoins, aucune différence d'expression n'était observée au niveau foliaire. En revanche, quand on étudie le gène paralogue de NPR1, ici NPR1-like protein 3, il est possible de constater qu'au niveau foliaire, l'expression est plus élevée chez le LT 3x. En effet, si la variété LT se comporte mieux que la variété LM (Gómez et al., 2008; Sivager et al., 2021), l'accumulation de SA ne serait pas nécessaire pour LT contrairement à LM.

En regard de l'analyse de gènes particuliers, la création de réseau de gènes a montré que les familles où il y avait une surexpression étaient principalement celles concernant les processus de biosynthèse de peptides ou encore d'amide. De plus, le réseau de gènes qui compare la variété sensible LM avec un porte-greffe 4x et 2x en condition Las+, a montré qui semble y avoir une relation entre greffon et porte-greffe comme il a été constaté plusieurs fois dans le **Chapitre 2**. Dans ce réseau, il a été montré qu'il y avait une surexpression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, or il est bien connu que certains stress peuvent entraîner la dégradation de l'ADN, notamment l'excès de métaux lourds (Küpper & Andresen, 2016; Lanier et al., 2019) comme par exemple le Cu. De plus, l'excès de ROS peut être nocif pour les acides nucléiques (Gill & Tuteja, 2010; Pospíšil & Prasad, 2014). En relation avec le taux de ROS généralement plus élevé pour la variété 2x par rapport à la variété 3x, il est alors intéressant de constater qu'avec un porte-greffe 4x, certains gènes sont impliqués dans la réparation de l'ADN potentiellement induite par un excès de ROS, ou encore de métaux lourds (observés dans le **Chapitre 1**).

Au niveau des racines de porte-greffes, bien qu'il y ait des catégories impliquées dans la biosynthèse de peptide ou encore d'amide, l'une des catégories les plus présentes étaient celle concernant la phosphorylation des protéines. La phosphorylation des protéines est importante dans la réponse de l'immunité des plantes et permet la survie de celles-ci avec tout un processus de signalisation impliquant les PAMPs, WRKY, etc. eux-mêmes impliqués dans la SAR (Park et al., 2012). Nos résultats ont montré que la ploïdie permettait une meilleure expression des gènes impliqués dans la phosphorylation des protéines (LM/Cit4x (Las-) > LM/Cit2x (Las-)) et que la ploïdie du greffon avait également un impact sur la meilleure expression de cette

catégorie (LT/Cit4x (Las-) > LM/Cit4x (Las-) et LT/Cit2x (Las-) > LM/Cit2x (Las-)) montrant ainsi encore une interaction entre greffon et porte-greffes.

L'analyse hormonale a permis de montrer que les plants infectés par Las présentaient un taux d'hormones plus élevé par rapport aux plants témoins. En effet, les résultats de dosage hormonal chez les feuilles 2x et 3x montrent une augmentation de l'ABA. L'ABA est considéré comme un indicateur de plants stressés (Rosales & Burns, 2011) car cette phytohormone a tendance à augmenter en cas de stress (Gómez-Cadenas et al., 2000; Sah et al., 2016), ici par le HLB.

Toujours chez les feuilles, une différence significative est observée chez cis-ZR entre plants témoins et plants infectés. Or, cette différence n'est pas observée dans les racines de porte-greffes alors qu'il est indiqué qu'elle interviendrait dans les racines afin de permettre l'élongation des poils pour pouvoir agrandir la surface d'absorption et maintenir la concentration en phosphate, nécessaire pour le développement des racines (Silva-Navas et al., 2019).

Enfin, les hormones IPR et JA ne semblent pas donner d'informations concluantes dans les dosages effectués alors que l'analyse de lipoxigénase 3 qui intervient dans la synthèse de JA montre une meilleure expression de ce gène dans les racines de porte-greffes 4x. La concentration de SA dans les feuilles 2x et 3x ainsi que les racines 2x et 4x augmente considérablement chez les plants infectés contrairement aux plants témoins. Ces résultats de taux de SA sont en accord avec les travaux de Nehela et al., (2018) qui indiquaient que les plants infectés avaient une concentration de SA bien plus élevée que celle retrouvée chez les plants témoins. Néanmoins, l'analyse subjective de certains gènes (*cf. 5.2.1.2. Analyse subjective de gènes impliqués dans le développement et la défense des plantes*) a montré une différence d'expression entre LM et LT concernant NPR1-like protein 3. Or, aucune différence n'est observable concernant la comparaison diploïde/polyploïde pour une même condition (témoin ou infecté). Bien que cette différence ne soit pas observable, il est quand même important de noter que les plants infectés se défendent bien face à la maladie du HLB. De plus, si l'accumulation de SA permet d'activer des gènes *NPR1* qui eux même activent des facteurs de transcription, le taux de SA retrouvé au niveau des racines des porte-greffes infectés par le HLB pourrait expliquer pourquoi le niveau d'expression de *WRKY35* est plus élevé chez les porte-greffes 2x et 4x en condition infecté par rapport aux porte-greffes en condition témoin.

Récemment, l'étude de Suh et al., (2021) a montré que certains métabolites, plus précisément deux aminoacides le glutamine et l'asparagine (ASN), augmentaient dans les

groupes d'agrumes tolérants à la maladie du HLB et ce indépendamment du statut témoin/infecté. Nos résultats, bien qu'ils ne concernent pour le moment que la partie foliaire, c'est-à-dire les greffons 2x et 3x, ont montré via le spectre de l'ASN, que ce métabolite a tendance à diminué en condition malade. Ces résultats préliminaires ne seraient pas en accord avec les différentes études (Albrecht et al., 2019; Killiny et al., 2018) qui ont montré une augmentation de ces deux aminoacides chez les cultivars d'agrumes tolérants mais aussi chez les agrumes contraints à la maladie car ceux-ci avaient tendance à augmenter en cas de stress. De plus, le spectre pour GABA semble indiquer des effets négatifs de la maladie. La tendance du GABA semble être contraire à ce qui peut être observé en cas de stress chez les plantes. En effet, il est indiqué que l'acide gamma-aminobutyrique a tendance à s'accumuler dans les tissus lors de stress biotiques ou abiotiques (Kinnersley & Turano, 2010) tels que les températures élevées, le stress oxydatif ou encore le stress salin. Son accumulation va permettre alors de moduler le développement des plantes en régulant l'activité spécifique de transporteurs d'anions spécifiques aux plantes (Ramesh et al., 2015). Nos résultats montrent une diminution de ce métabolite chez les agrumes 2x et 3x sous contrainte HLB.

Enfin, les résultats préliminaires du métabolome montrent qu'il y aurait bien un effet de la ploïdie du porte-greffe mais aussi un effet dû à l'interaction greffon/porte-greffe, effet ayant été constaté au préalable avec certains résultats obtenus dans le 2<sup>ème</sup> chapitre de cette thèse.

#### **5.4. Conclusion**

Les différentes analyses ont montré qu'il y avait bien un impact néfaste fort de la maladie du Huanglongbing sur l'expression de familles de gènes et sur les contenus de métabolites impliqués dans le développement de la plante. Il a été possible d'observer une forte concentration de SA qui joue un rôle crucial dans la SAR, importante contre l'attaque de pathogènes, ou encore de gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène. De plus, la création de réseaux de gènes a montré l'impact que pouvait avoir la ploïdie ainsi que l'interaction qu'il pouvait y avoir entre greffon et porte-greffe. Enfin, l'analyse générale (diagramme de Venn) et partielle a également permis de montrer que la polyploïdie pouvait jouer un rôle important dans la meilleure expression de certains mécanismes de défenses, notamment ceux contre les ROS et révélerait que l'association au niveau de ploïdie le plus élevé, LT/Cit4x, serait la plus tolérante face à la maladie.

## **6. *CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES***

Le Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement a pour objectif de favoriser une agriculture plus durable dans les régions tropicales et méditerranéennes. C'est dans cette optique que l'UMR AGAP qui comprend l'équipe SEAPAG s'est tournée sur la compréhension de l'une des maladies les plus dévastatrices de l'agrumiculture, le Huanglongbing. En comprenant cette maladie, il sera possible de proposer aux agriculteurs des variétés d'agrumes et des porte-greffes plus tolérants. En effet, même si les apparentés d'agrumes semblent être résistant à la maladie du HLB, il n'existe pas de résistance stricte à la maladie au sein des agrumes dits « vrais ». L'équipe SEAPAG s'est orientée vers une voie prometteuse qui concerne aussi bien le règne animal que végétal : la polyploïdie. Les études réalisées portent à la fois sur les variétés et sur les porte-greffes.

Il a été démontré, au fil des années, les avantages que pouvait apporter la polyploïdie. En effet, les études sur la pastèque (Yan et al., 2018), les poivrons (Penella et al., 2015) et le tabac (Liu et al., 2014) et notamment chez les agrumes (Allario et al., 2013) ont montré les aspects de tolérance qu'apportait la polyploïdie face aux différents stress comme le stress salin ou encore le déficit hydrique. D'autres études sur les agrumes ont montré l'efficacité des agrumes polyploïdes face au stress oxydatif induit par des températures froides (Oustric et al., 2017), une carence en nutriments (Oustric et al., 2019) ou encore le stress salin (Khalid et al., 2020). Ces différentes études ont montré que le taux des enzymes du système antioxydant, telles que la catalase ou encore l'ascorbate peroxidase, était plus élevé chez les agrumes 4x par rapport à leurs homologues respectifs 2x.

Dans le cadre de cette thèse, il a été convenu de décomposer l'étude des plants d'agrumes diploïdes et polyploïdes afin de connaître et d'identifier les différents déterminants physiologiques et moléculaires de leur réponse différentielle face à la maladie du HLB.

Le **Chapitre 1** de cette thèse a été consacré à l'étude de la réponse de limettiers Mexicain 2x et Tahiti 3x, greffés sur un porte-greffe 2x. Grâce à cette stratégie, il a été possible de connaître l'impact direct de la maladie mais aussi de la polyploïdie du greffon vis-à-vis du HLB.

Généralement, suite à un stress ou encore à l'attaque d'un pathogène, ici *Candidatus Liberibacter asiaticus*, les plantes synthétiseront de la callose (Chen & Kim, 2009). Dans le cas du HLB, maladie exclusivement phloémique, c'est au niveau des pores du phloème que la callose est retrouvée, bloquant ainsi le flux de sève élaborée comprenant les différents nutriments dont les sucres afin d'alimenter la plante dans les différents organes puits. Dans notre étude, en comparant les deux limettiers, il a été constaté que la synthèse du dépôt de

callose était beaucoup plus rapide dans le cas des pétioles de feuilles de limettier Mexicain 2x contrairement à ceux du limettier Tahiti 3x. Suite à ce blocage précoce au niveau des pores du phloème du LM, les activités physiologiques telles que la conductance stomatique et la photosynthèse vont chuter dès le stade Las+AS pour cette variété 2x et chuter drastiquement au stade tardif. La variété LT 3x présente également une chute de ces différentes activités mais continuera néanmoins de présenter, des activités plus élevées par rapport au LM. Cette réponse physiologique précoce du LM par rapport au LT peut certainement s'expliquer par la charge bactérienne qui est plus élevée dans LM, dès le stade Las+AS (les analyses de qPCR ont montré que le Ct était plus faible pour LM que celui du LT, ce qui était caractéristique d'une charge bactérienne beaucoup plus élevée dans LM et donc d'un stress plus important).

A ces données physiologiques, des résultats biochimiques ont permis de vérifier que le pouvoir antioxydant était beaucoup moins efficace chez LM 2x par rapport au LT 3x. Ces différents éléments comme la taille cellulaire (pores du phloème...) plus importante, des échanges respiratoires plus importants et de détoxification ainsi qu'un bouchage des pores moindre expliqueraient certainement la meilleure tolérance du LT 3x face à la maladie car celui-ci pourrait très certainement maintenir le flux de sève élaborée sur une plus longue période, permettant l'alimentation de la plante et donc de son développement.

Le but de cette thèse était de connaître les déterminants apportant une meilleure tolérance face à la maladie du HLB chez les polyploïdes d'agrumes. Or, ce travail a aussi comme portée de pouvoir proposer des choix d'agrumes aux agriculteurs locaux et internationaux. C'est dans cette optique qu'il serait intéressant de travailler sur les fruits des agrumes diploïdes et polyploïdes infectés par la maladie. En effet, même si les polyploïdes semblent se comporter mieux que les diploïdes (Gómez et al., 2008; Sivager et al., 2021), les fruits infectés par le HLB ont tendance à chuter rapidement et à être plus acides que les fruits sains à cause du taux de saccharose relativement bas (Bassanezi et al., 2009). En effet, les symptômes foliaires semblent moins nombreux pour les polyploïdes et la chute de feuilles et de fruits semble beaucoup plus importante chez les 2x (observation au champ, données non publiées). Néanmoins, améliorer la gestion concernant l'irrigation et la nutrition (observation au champ, données non publiées) permettrait de limiter l'impact sur les fruits entraînant ainsi moins de chute de ces derniers et donc moins de perte concernant la production. Une étude comparative sur la qualité de fruits d'agrumes diploïdes et polyploïdes permettrait de proposer aux agriculteurs, non seulement des arbres plus tolérants mais également des fruits qui correspondent aux attentes des consommateurs.

Les données complémentaires du 1<sup>er</sup> chapitre n'ont pas donné de résultats très différents excepté l'augmentation de glucose au fur et à mesure de la maladie (*cf. 3.2. Données complémentaires : analyses des composés de parois cellulaires de feuilles de limettiers Mexicain et Tahiti*) qui pouvait être caractéristique du dépôt de callose induits par la bactérie (Achor et al., 2020; Koh et al., 2012; Sivager et al., 2021). Cette analyse de parois cellulaires pourrait être réalisée sur des homologues afin de pouvoir peut-être mettre en évidence des différences. En effet, bien que le limettier Tahiti soit polyploïde (3x), c'est un génotype hétérozygote et n'est pas l'homologue du limettier Mexicain. Même si nos résultats sur le dosage du MDA, qui donne des informations sur la peroxydation des lipides (Luna et al., 2000; Tabassum et al., 2017), ont montré que le taux de celui-ci était plus élevé chez les 2x que chez les 3x, aucune différence significative de l'analyse des composés n'a pu être obtenue malgré l'importance des parois cellulaires dans la réponse aux stress (Seifert & Blaukopf, 2010). Ainsi, une étude d'analyse sur les parois cellulaires de feuilles d'agrumes 2x et 4x ayant le même patrimoine génétique (exemple citrumelo 2x, 4x ou encore volkameriana 2x, 4x) apporterait certainement des informations plus concrètes quant à la dégradation possible des parois cellulaires et apporterait également d'autres informations sur l'impact du HLB au niveau de la canopée.

L'étude d'agrumes apparentés résistants à la maladie serait une voie prometteuse dans la lutte contre le HLB (Ramadugu, 2019; Ramadugu et al., 2016). En effet, ces apparentés d'agrumes (*Eremocitrus*, *Microcitrus*) sont sexuellement compatibles avec les agrumes du genre *Citrus*. Ainsi, des études sur des variétés d'agrumes dits « vrais » greffées avec des porte-greffes résistants et non des porte-greffes uniquement tolérants pourraient voir le jour afin de connaître l'impact que peut avoir la maladie sur ces variétés. Une autre voie serait d'utiliser ces agrumes apparentés en tant qu'« inter-stock » entre la variété désirée et un porte-greffe polyploïde tolérant. De ce fait, avec nos données obtenues grâce à ces trois chapitres de thèse et l'évaluation d'associations « scion/inter-stock/porte-greffe » permettraient de vérifier si ces apparentés d'agrumes peuvent être à l'origine d'une résistance au HLB pour les cultivars d'agrumes dits « vrais ».

L'étude de Deng et al., (2019) a montré l'importance de la régénération du phloème dans la tolérance à la maladie au sein même d'agrumes 2x et Stover et al., (2015) a identifié des agrumes 2x qui présentaient une meilleure tolérance au HLB en comparaison avec la variété oranger Rhode red. Une première étude sur différents agrumes 2x (stage d'ingénieur de FILLON Inès que j'ai encadré – données non publiées) a montré l'impact que pouvait avoir la maladie sur ces variétés et pousser cette étude sur la possible régénération de phloème sur ces agrumes par rapport à l'oranger Rhode red, ainsi qu'une étude du pouvoir antioxydant



donnerait des informations sur la meilleure tolérance de ces derniers afin de les proposer aux agriculteurs.

Le **Chapitre 2** a permis d'obtenir des informations au niveau racinaire en analysant des porte-greffes d'agrumes 2x et 4x. Les différentes études sur les agrumes se sont souvent intéressées à des porte-greffes franc-pied en étudiant les différentes caractéristiques (système antioxydant) de ceux-ci mais au niveau de la canopée. Nos observations ont permis de montrer que la polyploïdie avait toujours pour conséquence d'augmenter la taille des cellules et notamment des racines (images macro et de MEB). De plus, les images macroscopiques des racines complétées avec celle du MEB ont montré qu'il y avait une forte dégradation racinaire et un affaissement cellulaire au niveau des cortex des racines de porte-greffes 2x contrairement aux racines de porte-greffes 4x, et ce peu importe la variété associée. Néanmoins, l'affaissement cellulaire était nettement plus important pour le porte-greffe 2x associé à la variété LM, elle aussi 2x.

Cette dégradation ne serait pas liée au dépôt de callose car dans notre étude des porte-greffes d'agrumes 2x et 4x, aucun dépôt de callose ne pouvait être observé dans les pores des cellules de phloème des racines de porte-greffes et serait due à l'action directe des bactéries qui utiliseraient les racines comme un réservoir pour leur développement et leur multiplication. Tout comme la partie foliaire, une analyse des composés de parois cellulaires serait intéressante car une dégradation des racines ainsi qu'un affaissement cellulaire du cortex sont observés dans le cas des échantillons de racines infectées par la bactérie responsable de la maladie du HLB. De plus, les porte-greffes analysés ont le même patrimoine génétique dans la mesure où correspondent à des diploïdes doublés (tétraploïdes). Les résultats escomptés seraient alors prometteurs sur l'impact que peut avoir la maladie et la ploïdie sur la composition et la modification des composés cellulaires et seraient certainement en accord avec les travaux de (Corneillie et al., 2019) au niveau des plants témoins avec une modification des composés de parois cellulaires entre diploïdes et polyploïdes. Dans la mesure où une dégradation racinaire est observée et que le MDA est un marqueur de la peroxydation des lipides (Tabassum et al., 2017), un dosage biochimique de MDA pourrait compléter cette étude. Enfin, un dosage d'amidon permettrait de vérifier si, en effet, les carbohydrates ne sont pas des facteurs limitants pour la perte du système racinaire.

Nos résultats d'hybridation *in situ* à fluorescence ont montré que la charge bactérienne était beaucoup plus forte dans les racines de porte-greffes 2x par rapport à celles de porte-greffes 4x. La polyploïdie pourrait donc être un facteur limitant le développement et la propagation de Las au niveau des racines. Les conséquences du bouchage précoce des pores du phloème chez le

LM (**Chapitre 1**) expliqueraient pourquoi la charge bactérienne semble plus importante lorsque la variété associée au porte-greffe (2x ou 4x) est le LT. Dans la mesure où le flux de sève est altéré voire interrompu, la bactérie se retrouve au niveau des cellules du phloème dans pétioles des feuilles de la variété 2x. En revanche, avec des pores peu obstrués par le dépôt de callose au niveau des pétioles de la variété 3x, les bactéries peuvent être transportées dans le flux de sève et peuvent se retrouver dans les racines de porte-greffes 2x ou 4x afin de pouvoir se multiplier.

L'importance de la réponse des porte-greffes face au stress oxydatif est tout aussi importante étant donné que les agrumes ne sont plus cultivés de franc-pied. De ce fait, une analyse électrochimique et un dosage biochimique des polyphénols ont été réalisés afin de déterminer le pouvoir antioxydant au niveau des racines des porte-greffes 2x et 4x. Grâce à cette analyse, il a été possible d'observer que le pouvoir antioxydant des 4x était plus important que celui des 2x. Le dosage des polyphénols, molécules ayant aussi des propriétés antioxydantes, a permis de confirmer cette analyse électrochimique. Une information supplémentaire apportée par ce dosage, est qu'il existait une relation étroite entre le greffon et le porte-greffe. Cette relation avait pu être mise en évidence au travers des différents résultats de FISH.

Le **Chapitre 3** de cette thèse a eu pour but de s'intéresser à l'expression du génome chez les plants diploïdes et polyploïdes aussi bien au niveau du greffon (feuilles) que du porte-greffe (racines). Des analyses hormonales et du métabolome ont également été réalisées et ont permis de montrer l'impact de la ploïdie face au HLB, avec une diminution du nombre de gènes différentiellement exprimés quand le niveau de ploïdie augmentait (**LM2/ Cit2x > LT/Cit2x > LM/Cit4x > LT/Cit4x** ; diagramme de Venn). Il a été intéressant de voir que même s'il semble avoir un faible nombre de gènes différentiellement exprimés chez les individus polyploïdes, la polyploïdie jouait un rôle quant à une meilleure expression de certains gènes contre l'action des ROS ou encore dans l'implication de gènes face à l'attaque de certains pathogènes. Néanmoins, bien que certains gènes impliqués dans la photosynthèse permettent un maintien du développement des agrumes polyploïdes, il a été possible d'observer que l'impact du HLB sur les plants d'agrumes aussi bien 2x que polyploïdes était fortement néfaste sur l'expression de certains gènes intervenant dans le développement des plants d'agrumes, notamment la superfamille cytochrome P450 où une chute considérable de l'expression de ce gène était observable dans tous les porte-greffes 2x et 4x. De plus, une étude plus approfondie de l'analyse par RNAseq serait intéressante car les réseaux de gènes ont permis de montrer qu'il y avait une différence d'expression dans des catégories concernant la biosynthèse de peptide et

donc impliquées dans la synthèse de protéines au niveau des greffons et que même si ces catégories étaient retrouvées au niveau racinaire, c'est surtout la phosphorylation des protéines qui était grandement représentée. La phosphorylation des protéines joue un rôle important dans la réponse des plantes. L'approfondissement de l'étude du transcriptome devrait nous permettre d'identifier correctement les gènes apportant une meilleure tolérance face à la maladie du HLB et permettrait d'avoir un plus grand lien avec les données obtenues sur l'analyse hormonale. Cependant, contrairement aux résultats du transcriptome, l'analyse des hormones n'a pas permis de montrer l'impact de la polyploïdie. Cette analyse a néanmoins montré que malgré la maladie, les plants infectés avaient tendance à bien synthétiser l'acide salicylique, hormone clé dans la mise en place de la résistance systémique acquise. Il serait important d'augmenter le nombre d'échantillon afin de potentiellement voir l'impact de la polyploïdie sur le taux des hormones impliquées dans la réponse aux stress abiotiques. Ainsi, derrière cet énorme jeu de données de transcriptomique et d'expression hormonale existerait bien un lien sur la résistance systémique acquise qui serait certainement un atout clé quant à la réponse face à la maladie du HLB. L'étude des gènes impliqués dans la SAR serait alors une alternative dans la meilleure tolérance des plants d'agrumes 2x ou polyploïdes face à la maladie.

En plus de la littérature (Allario et al., 2013; Jayswal & Lal, 2020; Ruiz et al., 2020), les données du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> chapitres ont montré qu'une relation entre greffon et porte-greffes pouvait exister, ainsi identifier les gènes clés dans la tolérance (voire résistance) au HLB permettrait la création de porte-greffes ou variétés plus tolérants.

L'importance des microRNA (miRNA) contre les stress environnementaux et leur relation avec le développement des plantes a pu être démontré chez différentes espèces de plantes afin d'agir sur différents types de stress abiotiques comme la sécheresse (Zhao et al., 2007) ou encore le stress salin et le stress oxydatif (revue Pervaiz et al., 2022). Ces miRNA jouent un rôle important dans la réponse post-transcriptionnelle en ciblant les ARNm. Identifier les gènes d'intérêt permettrait alors d'observer si la maladie du HLB induit des miRNA et altère donc l'expression de certains gènes impliqués dans le développement ou encore la défense des plantes.

Enfin, le travail partiel sur l'analyse du métabolome n'a pas permis d'obtenir de conclusion définitive sur la composition métabolomique foliaire et racinaire. Nos résultats, bien qu'ils soient préliminaires, ne sont pas en accord avec ce qui pouvait être observé dans la littérature (Albrecht et al., 2019; Killiny et al., 2018; Kinnersley & Turano, 2010). Néanmoins, ces analyses métabolomiques devront se poursuivre afin de connaître de manière plus précise les changements métabolomiques au niveau des feuilles mais aussi au niveau des racines. Il serait

intéressant de vérifier si la polyploïdie impacte sur le taux de métabolites impliqués dans la défense des plantes. En effet, les travaux de Killiny & Hijaz, (2016) ont démontré que les métabolites tels que la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane avaient un niveau plus élevé chez les cultivars d'agrumes tolérants à la bactérie et donc au HLB. Enfin, en regard des analyses du métabolome sur les feuilles de limettiers 2x et 3x, il existe un impact des porte-greffes chez les agrumes cultivés de façon bi-composite car la composition métabolique des feuilles et des racines et la réponse à *Candidatus Liberibacter asiaticus* serait influencée par les porte-greffes (Albrecht et al., 2019).

*In fine*, bien que la maladie du Huanglongbing soit la maladie bactérienne la plus dévastatrice des agrumes, les éléments apportés dans cette thèse ont permis de montrer l'importance de la polyploïdie dans la meilleure tolérance face à la maladie du HLB. De plus, les données obtenues ont permis d'identifier certains déterminants physiologiques et moléculaires à l'origine de cette meilleure tolérance dans les deux principales catégories que constitue une plante (feuilles et racines).

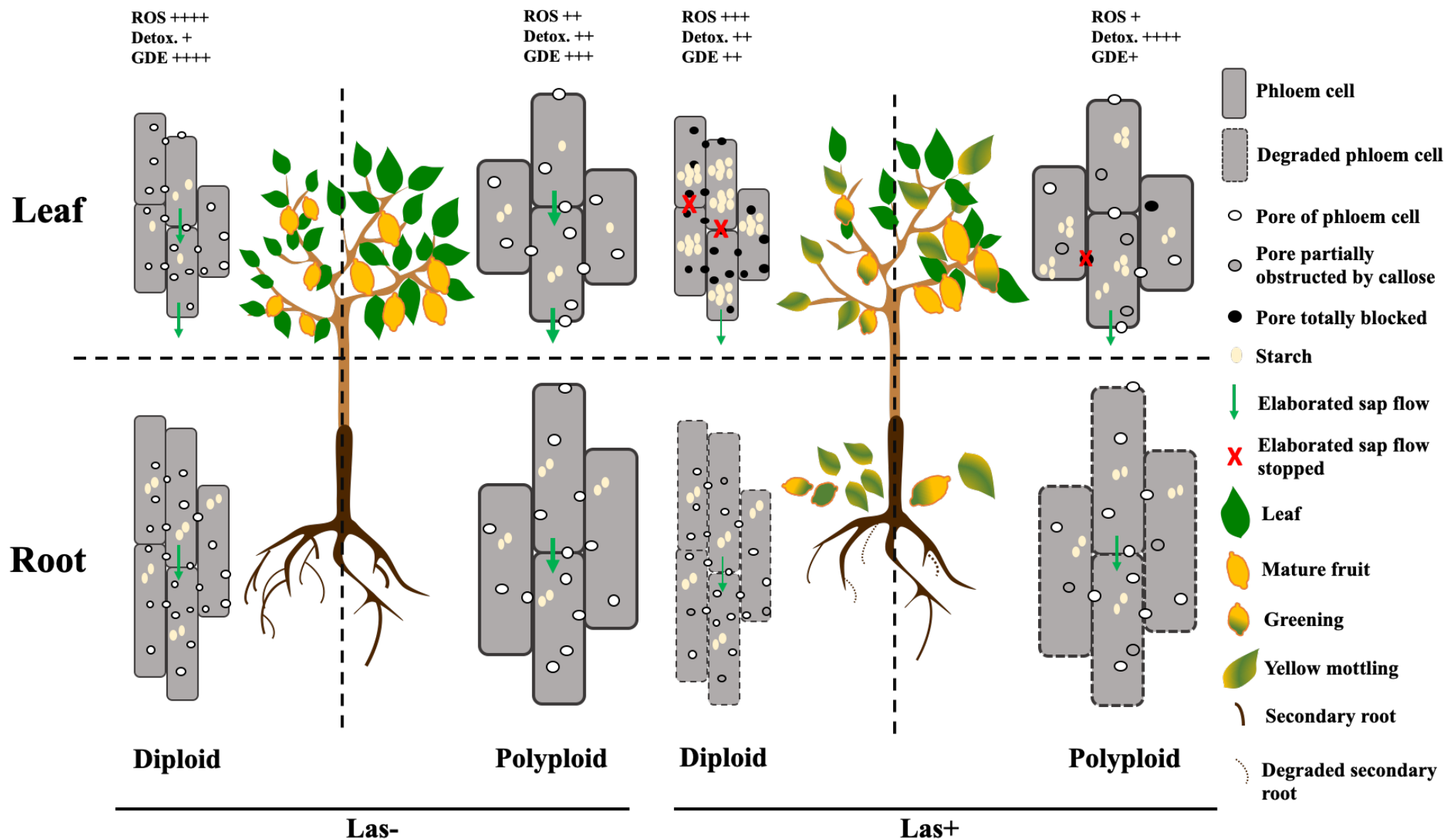


Figure 35 - Impact du HLB (Las+) ou non (Las-) sur au niveau des pores du phloème de pétioles de feuilles ou de racines diploïdes ou polyplôïdes entraînant des conséquences externes

# ***ANNEXES***

# Annexe 1

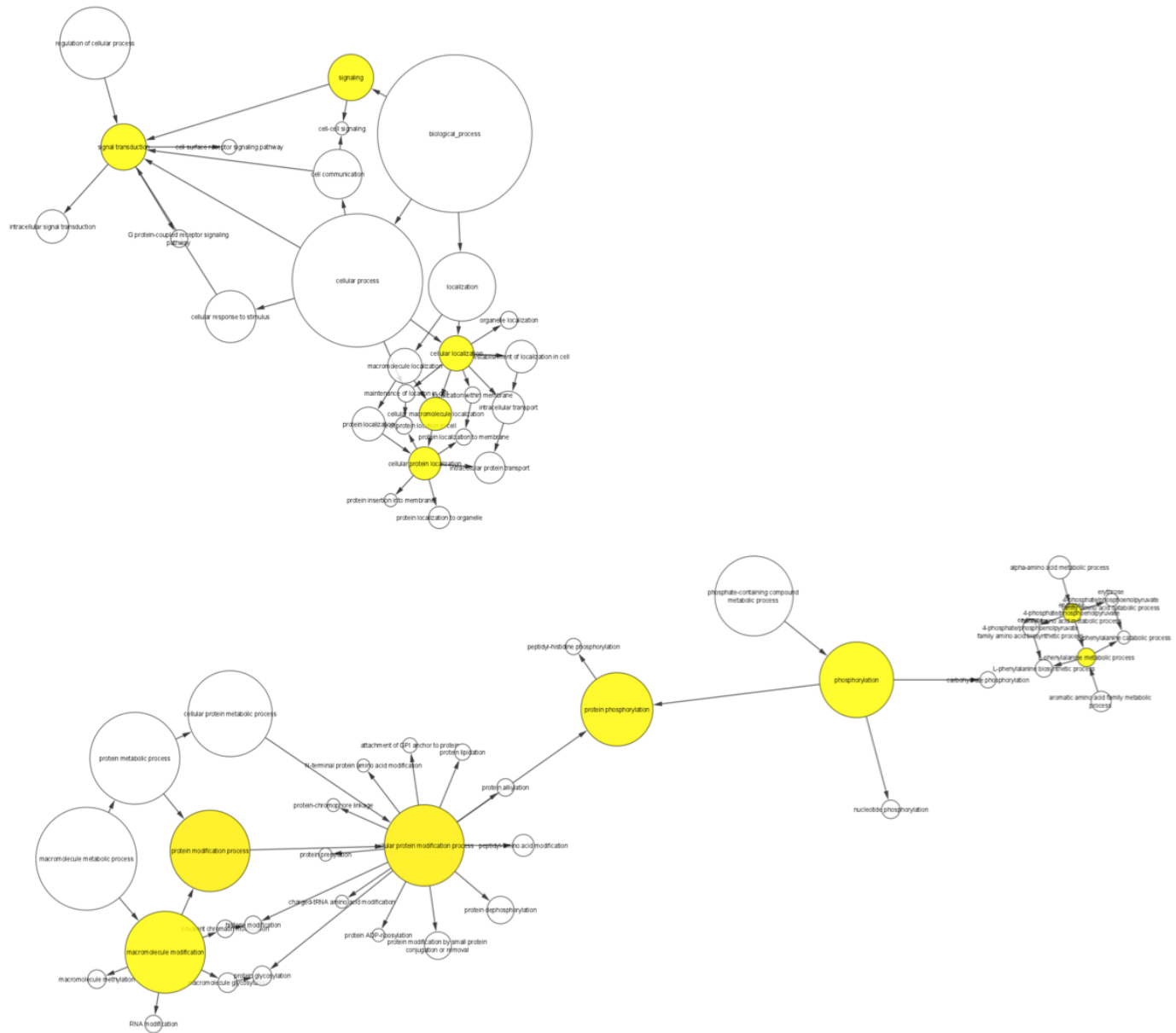


Figure 36 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de racines de porte-greffe citrumelo 2x greffé avec LT 3x et LM 2x en condition témoin dans le cluster Brown. Les cercles colorés indiquent sur l'intensité de la sous-expression.

## Annexe 2

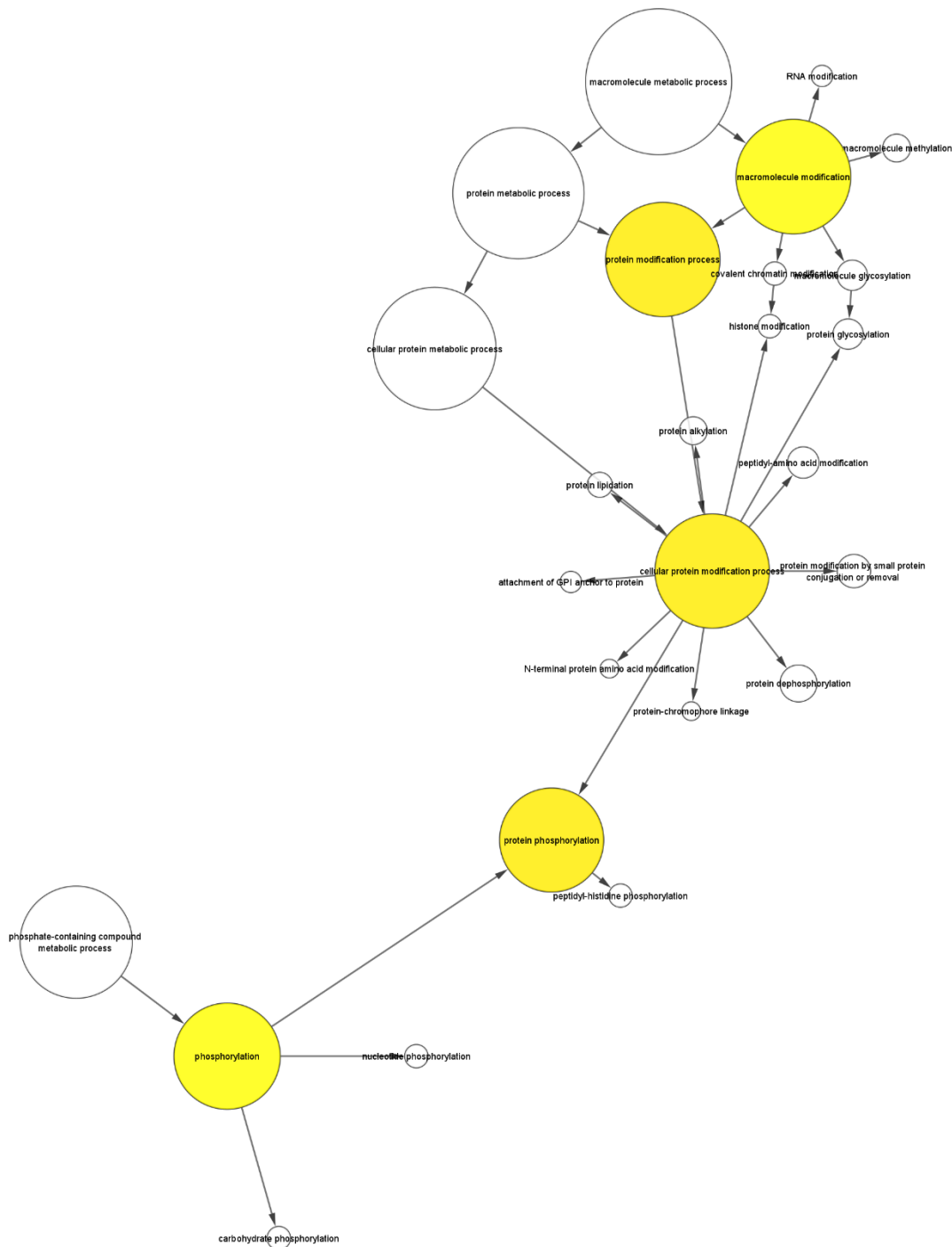


Figure 37 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de racines de porte-greffe citrumelo 4x greffé avec LT 3x et LM 2x en condition témoin dans le cluster Brown. Les cercles colorés indiquent sur l'intensité de la sous-expression



### Annexe 3

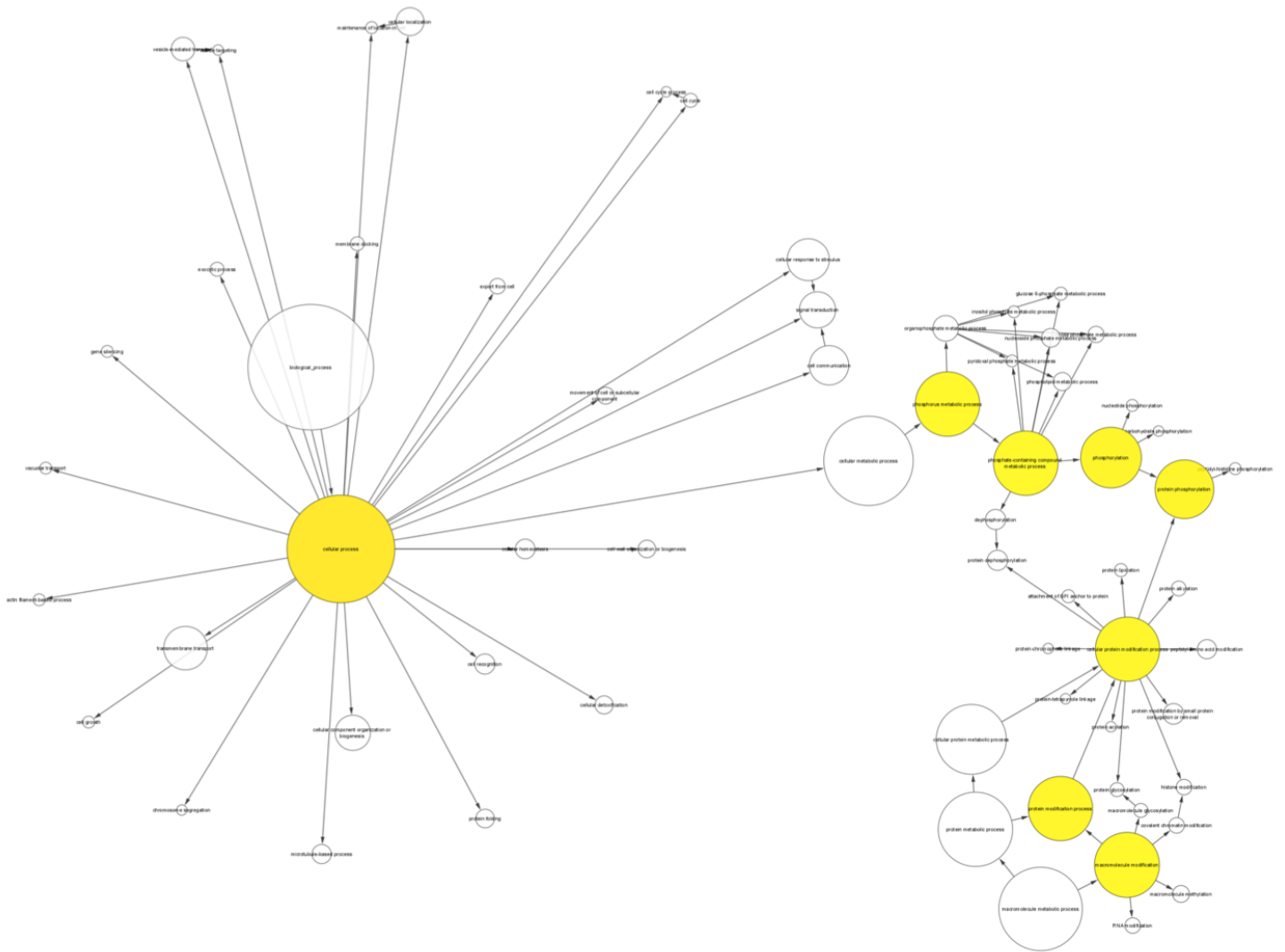


Figure 38 - Réseau de gènes surexprimés après analyse de racines de porte-greffes citrumelo 4x et 2x greffé avec le limettier 2x en condition témoin. Les cercles colorés indiquent sur l'intensité de la surexpression.

## ***7. ENCADREMENTS***

## 7.1. Encadrements de stagiaires

- 2018

**UGOLIN Maëlys**, Master 1, 1 mois

**Sujet** : Analyse microscopique de racines de porte-greffes (diploïdes et tétraploïdes) et de leurs interactions avec la bactérie responsable du Huanglongbing.

- 2019

**MORINO Elsa**, IUT, 3 mois

**Sujet** : Analyse des propriétés de tolérance au HLB d'associations de porte-greffes citrumelo diploïdes et tétraploïdes / greffons limettiers diploïdes et triploïdes

- 2020

**FILLON Inès**, Ingénieur, 6 mois

**Sujet** : Analyse par microscopie à balayage des vaisseaux du phloème de variétés d'agrumes potentiellement plus tolérantes / résistantes au Huanglongbing.

**MONDÉLICE François-Xavier**, Master 1, 1 mois

**Sujet** : Caractérisation au niveau cellulaire de la présence de la bactérie responsable du HLB chez des porte-greffes diploïdes et tétraploïdes

**UGOLIN Maëlys**, Master 2, 6 mois

**Sujet** : Caractérisation au niveau cellulaire de la présence de la bactérie responsable du HLB (*Candidatus Liberibacter*) chez des porte-greffes diploïdes et tétraploïdes.

- 2021

**MISANTROPE Mélanie**, Licence 3, 1 mois

**Sujet** : Mise au point d'une méthode de visualisation de la bactérie *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) et de son impact au niveau du stress oxydatif de porte-greffes diploïdes et tétraploïdes d'agrumes.

## **7.2. Enseignements vacataires**

- 2021 – 2021 :

Vacation au sein de l'UFR Sciences Exactes Naturelles de l'Université des Antilles sous la direction de Mme INAMO-VATIN Magalie.

Master 1 Biologie Santé : Fondements en biologie moléculaire

Licence 1 Sciences pour la Santé : Biochimie des macromolécules

Licence 3 Sciences pour la Santé : Biochimie des protéines

***RÉFÉRENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

- Achor, D. S., Etxeberria, E., Wang, N., Folimonova, S. Y., Chung, K. R., & Albrigo, L. G. (2010). Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal*, 9(2), 56–64. <https://doi.org/10.3923/ppj.2010.56.64>
- Achor, D., Welker, S., Ben-Mahmoud, S., Wang, C., Folimonova, S. Y., Dutt, M., ... Levy, A. (2020). Dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* movement and sieve-pore plugging in citrus sink Cells1[OPEN]. *Plant Physiology*, 182(2), 852–891. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01391>
- Adams, K. L., Cronn, R., Percifield, R., & Wendel, J. F. (2003). Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4649–4654. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630618100>
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012, November 1). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, Vol. 196, pp. 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
- Ajene, I. J., Khamis, F. M., van Asch, B., Pietersen, G., Seid, N., Rwomushana, I., ... Ekesi, S. (2020). Distribution of *Candidatus Liberibacter* species in Eastern Africa, and the first report of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Kenya. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60712-0>
- Albrecht, U., Tripathi, I., & Bowman, K. D. (2019). Rootstock influences the metabolic response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* in grafted sweet orange trees. *Trees* 2019 34:2, 34(2), 405–431. <https://doi.org/10.1007/S00468-019-01925-3>
- Albrigo, L. G. ., Aritua, V. ., Wang, N. ., & Achor, D. (2014). Phloem disruption from HLB infection in canopy and root framework. *Journal of Citrus Pathology*, 1(1).
- Albrigo, L. G., & Stover, E. W. (2015). Effect of plant growth regulators and fungicides on Huanglongbing-related preharvest fruit drop of citrus. *HortTechnology*, 25(6), 785–790. <https://doi.org/10.21273/horttech.25.6.785>
- Allario, T, Brumos, J., Colmenero-Flores, J. M., Iglesias, D. J., Pina, J. A., Navarro, L., ... Morillon, R. (2013). Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant, Cell & Environment*, 36(4), 856–868. <https://doi.org/10.1111/pce.12021>
- Allario, Thierry, Brumos, J., Colmenero-Flores, J. M., Tadeo, F., Froelicher, Y., Talon, M., ...

- Morillon, R. (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. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2507–2519. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq467>
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92(6), 773–784. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81405-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81405-1)
- Alves, M. N., Lopes, S. A., Raiol-Junior, L. L., Wulff, N. A., Girardi, E. A., Ollitrault, P., & Peña, L. (2021). Resistance to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ the Huanglongbing associated bacterium, in sexually and/or graft-compatible *citrus* relatives. *Frontiers in Plant Science*, 11(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617664>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU638>
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., ... Sheen, J. (2002). Map kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415(6875), 977–983. <https://doi.org/10.1038/415977a>
- Ausubel, F. M. (2005, October 21). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology*, Vol. 6, pp. 973–979. <https://doi.org/10.1038/ni1253>
- Bajpai, P. (2018). Wood and fiber fundamentals. In *Biermann’s Handbook of Pulp and Paper* (pp. 19–74). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814240-0.00002-1>
- BARNABÁS, B., JÄGER, K., & FEHÉR, A. (2007). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell & Environment*, 0(0), 071030190532001-???. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x>
- Baron, K. N., Schroeder, D. F., & Stasolla, C. (2012). Transcriptional response of abscisic acid (ABA) metabolism and transport to cold and heat stress applied at the reproductive stage of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 188–189, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.03.001>
- Baslam, M., Mitsui, T., Hodges, M., Priesack, E., Herritt, M. T., Aranjuelo, I., & Sanz-Sáez, Á. (2020, July 6). Photosynthesis in a changing global climate: Scaling up and scaling down in Crops. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00882>
- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Gasparoto, M. C. G., Filho, A. B., & Amorim, L. (2011). Yield loss caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo,

- Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 130(4), 577–586. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9779-1>
- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., & Stuchi, E. S. (2009). Effects of Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 125(4), 565–572. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9506-3>
- Beest, M., Le Roux, J. J., Richardson, D. M., Brysting, A. K., Suda, J., Kubešová, M., & Pyšek, P. (2012, January). The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany*, Vol. 109, pp. 19–45. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr277>
- Belkadhi, A., De Haro, A., Soengas, P., Obregon, S., Cartea, M. E., Djebali, W., & Chaïbi, W. (2013). Salicylic acid improves root antioxidant defense system and total antioxidant capacities of flax subjected to cadmium. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 17(7), 398–406. <https://doi.org/10.1089/omi.2013.0030>
- Bhattacharjee, S. (2012). The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany*, 2012, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2012/985298>
- Bitters, W. P. (1986). Citrus rootsocks: their characters and reactions.
- Blaustein, R. A., Lorca, G. L., & Teplitski, M. (2018). Challenges for managing *Candidatus Liberibacter* spp. (Huanglongbing disease pathogen): Current control measures and future directions. *Phytopathology*®, 108(4), 424–435. <https://doi.org/10.1094/phyto-07-17-0260-rvw>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>
- Bové, J. M. (2006, March 1). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, Vol. 88, pp. 7–37. <https://doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828>
- Bové, J. M., Cal, E. C., Capoor, S. P., & Cortez, R. E. (1974). Influence of temperature on symptoms of California Stubborn, South African greening, India citrus decline, and Philippines leaf mottling diseases. *Proceedings of 6th Conference IOVC*, 1–11.
- Bowler, C., Montagu, M. V., & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43(1), 83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.000503>
- Bretagnolle, F., & Thompson, J. D. (1995). Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*, 129(1), 1–22. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb03005.x>



- Brissac, T., Rodrigues, C. F., Gros, O., & Bastien Duperron, S. (n.d.). *Characterization of bacterial symbioses in Myrtea sp. (Bivalvia: Lucinidae) and Thyasira sp. (Bivalvia: Thyasiridae) from a cold seep in the Eastern Mediterranean.* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2010.00413.x>
- Broekaert, W. F., Delauré, S. L., De Bolle, M. F. C., & Cammue, B. P. A. (2006, August 8). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 44, pp. 393–416. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143440>
- Bruyère, O., Altman, R. D., & Reginster, J. Y. (2016). Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45(4), S12–S17. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.11.011>
- Cameron, J. W., & Frost, H. B. (1968). Genetics, breeding, and nucellar embryony. In *The Citrus Industry*.
- Camille Jacquemond, Franck Curck, Marion Heuzet, C. (2013). *Les clémentiniers et autres petits agrumes* (1ère Editi; E. Quae, Ed.).
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 Suppl), 1011. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600016>
- Chen, X. Y., & Kim, J. Y. (2009, June). Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling and Behavior*, Vol. 4, pp. 489–492. <https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8359>
- Cheruiyot, E. K., Mumera, L. M., Ng'etich, W. K., Hassanali, A., & Wachira, F. (2007). Polyphenols as potential indicators for drought tolerance in tea (*Camellia sinensis* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(9), 2190–2197. <https://doi.org/10.1271/BBB.70156>
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 72, 1–20. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2013.05.009>
- Choudhary, A., Kumar, A., & Kaur, N. (2020, February 1). ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Diversity*, Vol. 42, pp. 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2019.10.002>
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856–867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>

- Christoffels, A., Koh, E. G. L., Chia, J., Brenner, S., Aparicio, S., & Venkatesh, B. (2004). Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(6), 1146–1151. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh114>
- Comai, L. (2005, November 11). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 6, pp. 836–846. <https://doi.org/10.1038/nrg1711>
- Corneillie, S., De Storme, N., Van Acker, R., Fangel, J. U., De Bruyne, M., De Rycke, R., ... Boerjan, W. (2019). Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. *Plant Physiology*, *179*(1), 74–87. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00967>
- Couplan, F. (2012). *Les plantes et leurs noms - Histoires insolites - François Couplan (EAN13 : 9782759218462) | Librairie Quae : des livres au coeur des sciences* (1ère édition; Editions Quae, Ed.). Retrieved from <https://www.quae.com/produit/1115/9782759218462/les-plantes-et-leurs-noms>
- Dai, F., Wang, Z., Luo, G., & Tang, C. (2015). Phenotypic and transcriptomic analyses of autotetraploid and diploid mulberry (*Morus alba* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 22938–22956. <https://doi.org/10.3390/ijms160922938>
- Dala-Paula, B. M., Plotto, A., Bai, J., Manthey, J. A., Baldwin, E. A., Ferrarezi, R. S., & Gloria, M. B. A. (2019, January 22). Effect of huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01976>
- Dala Paula, B. M., Raithore, S., Manthey, J. A., Baldwin, E. A., Bai, J., Zhao, W., ... Plotto, A. (2018). Active taste compounds in juice from oranges symptomatic for Huanglongbing (HLB) citrus greening disease. *LWT - Food Science and Technology*, *91*, 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.083>
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014, December 2). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, Vol. 2, p. 53. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- de Campos, M. K. F., de Carvalho, K., de Souza, F. S., Marur, C. J., Pereira, L. F. P., Filho, J. C. B., & Vieira, L. G. E. (2011). Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic ‘Swingle’ citrumelo plants over-accumulating proline. *Environmental and Experimental Botany*, *72*(2), 242–250. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2011.03.009>
- De Storme, N., & Geelen, D. (2013). Sexual polyploidization in plants-cytological mechanisms

- and molecular regulation. *The New Phytologist*, 198(3), 670–684. <https://doi.org/10.1111/nph.12184>
- Deng, H., Achor, D., Exteberria, E., Yu, Q., Du, D., Stanton, D., ... Gmitter, F. G. (2019). Phloem regeneration is a mechanism for huanglongbing-tolerance of “bearss” lemon and “LB8-9” sugar belleopensisupspi@closespisupspi mandarin. *Frontiers in Plant Science*, 10, 277. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00277>
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell*, 173(6), 1454-1467.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.044>
- Dmytriiev, O. P., & Kravchuk, Z. M. (2005). [Reactive oxygen species and plant immunity]. *Tsitol Genet*, 39(4), 64–74.
- do Carmo Teixeira, D., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., da Costa, P. I., Ayres, A. J., & Bové, J. (2005). “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1857–1862. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63677-0>
- Doménech-Carbó, A., Cebrián-Torrejón, G., Lopes-Souto, A., Martins-De-Moraes, M., Jorge-Kato, M., Fachine-Tavares, J., & Barbosa-Filho, J. M. (2015). Electrochemical ecology: VIMP monitoring of plant defense against external stressors. *RSC Advances*, 5(75), 61006–61011. <https://doi.org/10.1039/C5RA11336A>
- Doménech-Carbó, A., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., & Domínguez, I. (2015). Contact probe voltammetry for in situ monitoring of the reactivity of phenolic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) compounds with ROS. *Talanta*, 144, 1207–1215. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2015.07.092>
- Doménech-Carbó, A., Ibars, A. M., Prieto-Mossi, J., Estrelles, E., Scholz, F., Cebrián-Torrejón, G., & Martini, M. (2015). Electrochemistry-based chemotaxonomy in plants using the voltammetry of microparticles methodology. *New Journal of Chemistry*, 39(9), 7421–7428. <https://doi.org/10.1039/C5NJ01233C>
- Doménech-Carbó, A., Martini, M., de Carvalho, L. M., Viana, C., Doménech-Carbó, M. T., & Silva, M. (2013). Screening of pharmacologic adulterant classes in herbal formulations using voltammetry of microparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 74, 194–204. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2012.10.031>
- Duportal, M., Jorda, E., Sanchez, C., Imbert, E., Loeillet, D., & Vannière, H. (2013). *Citron. FruiTrop (h.s. FOCUS)*. Montpellier.

- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004a). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004b). SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Eckert, C., Xu, W., Xiong, W., Lynch, S., Ungerer, J., Tao, L., ... Yu, J. (2014). Ethylene-forming enzyme and bioethylene production. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-33/TABLES/1>
- Ed Etxeberria, Narciso, C., Sood, P., Gonzalez, P., & Narcis, J. (2009). The Anatomy of a Laser Label. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 122(863), 347–349. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/9a7a/ad03e1d9e88599d889822d35c6a82bcbb675.pdf>
- Ed Stover, Gregory T. McCollum, Randall Driggers, Richard Lee, Robert Shatters Jr., YongPing Duan, ... David G. Hall. (2015). Resistance and tolerance to Huanglongbing in Citrus. *Acta Horticulturae*, 1065(1065), 899–903. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.111>
- Étienne, J., Quilicib, S., Marival, D., & Franckb, A. (2001). Biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Guadeloupe by imported *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae). *Fruits*, 56(5), 307–315. <https://doi.org/10.1051/fruits:2001131>
- Etxeberria, E., & Narciso, C. (2015). Anatomy of the citrus leaf petiole: Healthy vs. Huanglongbing. *Acta Horticulturae*, 1065, 891–898. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.110>
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- FAO. (2003). Problèmes phytosanitaires du secteur des agrumes et politique de lutte.
- FAO. (2017). Citrus Fruit - Fresh and Processed (Statistical Bulletin 2016).
- FAO. (2021). Citrus Fruit - Fresh and Processed (Statistical Bulletin 2020).
- Fincher, G. B. (2009, January). Revolutionary times in our understanding of cell wall biosynthesis and remodeling in the grasses. *Plant Physiology*, Vol. 149, pp. 27–37. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130096>
- Folimonova, S. Y., & Achor, D. S. (2010). Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology*, 100(9), 949–958. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-9-0949>

- Fox, D. T., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Ashman, T. L., & Van de Peer, Y. (2020, September 1). Polyploidy: A biological force from cells to ecosystems. *Trends in Cell Biology*, Vol. 30, pp. 688–694. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.006>
- Freeland, R. S. (2016). Surveying the near-surface fibrous citrus root system of the orange tree with 3-D GPR. *Applied Engineering in Agriculture*, 32(2), 145–153. <https://doi.org/10.13031/aea.32.10859>
- Freeman, B. C., & Beattie, G. A. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2008-0226-01>
- Frendo, P., Baldacci-Cresp, F., Benyamina, S. M., & Puppo, A. (2013). Glutathione and plant response to the biotic environment. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 724–730. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.07.035>
- Froelicher, Y., Bassene, J. B., Jedidi-Neji, E., Dambier, D., Morillon, R., Bernardini, G., ... Ollitrault, P. (2007). Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: Induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Reports*, 26(7), 937–944. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0314-y>
- Fry, S. C. (1988). The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis. *The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*.
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 839–863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
- Gilchrist, D. G. (1998). Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology*, 36(1), 393–414. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.393>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gómez-Cadenas, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., Primo-Millo, E., & Talon, M. (2000). Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta* 210:4, 210(4), 636–643. <https://doi.org/10.1007/S004250050054>
- Gómez, H. D., En, H. L. B., & Florida, L. A. (2008). Experiences on Hlb ( Huanglongbing ) Symptoms Detection in Florida. *Response*, 1–7.
- Gottwald, T. R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annu. Rev. Phytopathol*, 48, 119–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114418>
- Graham, J. H., Johnson, E. G., Gottwald, T. R., & Irey, M. S. (2013). Presymptomatic fibrous

- root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. *Plant Disease*, 97(9), 1195–1199. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0024-RE>
- Grausem, B., Widemann, E., Verdier, G., Nosbüsch, D., Aubert, Y., Beisson, F., ... Pinot, F. (2014). CYP77A19 and CYP77A20 characterized from *Solanum tuberosum* oxidize fatty acids in vitro and partially restore the wild phenotype in an *Arabidopsis thaliana* cutin mutant. *Plant, Cell and Environment*, 37(9), 2102–2115. <https://doi.org/10.1111/pce.12298>
- Grennan, A. K. (2006). Plant response to bacterial pathogens. Overlap between innate and gene-for-gene defense response. *Plant Physiology*, 142(3), 809–811. <https://doi.org/10.1104/pp.106.900207>
- Grosser, J., Omar, A., Gmitter, J., & Syvertsen, J. P. (2012). Salinity tolerance of ‘ Valencia ’ Orange trees on allotetraploid rootstocks. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 50–55.
- Grosser, J. W., & Gmitter, F. G. (2011, March 1). Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: Applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 104, pp. 343–357. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9823-4>
- Ha, P. T., He, R., Killiny, N., Brown, J. K., Omsland, A., Gang, D. R., & Beyenal, H. (2019). Host-free biofilm culture of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*,” the bacterium associated with Huanglongbing. *Biofilm*, 1, 100005. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100005>
- Hamilton, A. J., Bouzayan, M., & Grierson, D. (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7434. <https://doi.org/10.1073/PNAS.88.16.7434>
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 44(3), 321–334. <https://doi.org/10.1023/A:1026592509060>
- Hilf, M. E., Sims, K. R., Folimonova, S. Y., & Achor, D. S. (2013). Visualization of ‘ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ’ cells in the vascular bundle of citrus seed coats with Fluorescence *In Situ* Hybridization and Transmission Electron Microscopy. 103(6).
- Holm, J., Björck, I., Drews, A., & Asp, N.-G. (1986). A rapid method for the analysis of starch. *Starch - Stärke*, 38(7), 224–226. <https://doi.org/10.1002/star.19860380704>
- Huang, C. Y., Araujo, K., Sánchez, J. N., Kund, G., Trumble, J., Roper, C., ... Jin, H. (2021). A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(6), 2021. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019628118>

- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., & Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 800. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00800/BIBTEX>
- Hussain, S., Curk, F., Dhuique-Mayer, C., Urban, L., Ollitrault, P., Luro, F., & Morillon, R. (2012). Autotetraploid trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) rootstocks do not impact clementine quality but reduce fruit yields and highly modify rootstock/scion physiology. *Scientia Horticulturae*, *134*, 100–107. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2011.11.008>
- Inagaki, Y., Cong, V. H., & Sakakibara, Y. (2016). Identification and application of Phyto-Fenton reactions. *Chemosphere*, *144*, 1443–1450. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.039>
- Inoue, H., Yamashita-Muraki, S., Fujiwara, K., Honda, K., Ono, H., Nonaka, T., ... Masaoka, Y. (2020). Fe<sup>2+</sup> ions alleviate the symptom of citrus greening disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms21114033>
- J. Etienne, D. B. and C. G. (1998). *Diaphorina citri* (Kuwayama) en Guadeloupe, premier signalement pour les Caraïbes (Hem., Psyllidae). *Bulletin de La Société Entomologique de France*.
- Jagoueix, S., Bove, J. M., & Garnier, M. (1994). The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the  $\alpha$  subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *44*(3), 379–386. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-379>
- Janick, J. (2005). Plant Breeding Reviews. In Jules Janick (Ed.), *Plant Breeding Reviews* (Vol. 25). <https://doi.org/10.1002/9780470650301>
- Jayswal, D., & Lal, N. (2020). Rootstock and scion relationship in fruit crops. *2*(11).
- Jebara, S., Jebara, M., Limam, F., & Aouani, M. E. (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, *162*(8), 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.10.005>
- Johnson, C., Boden, E., & Arias, J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. *Plant Cell*, *15*(8), 1846–1858. <https://doi.org/10.1105/tpc.012211>
- Johnson, E. G., Wu, J., Bright, D. B., & Graham, J. H. (2013). Association of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathology*, *63*(2), 290–298. <https://doi.org/10.1111/ppa.12109>

- Kampfenkel, K., Vanmontagu, M., & Inze, D. (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 225(1), 165–167. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1995.1127>
- Khalid, M. F., Hussain, S., Anjum, M. A., Ahmad, S., Ali, M. A., Ejaz, S., & Morillon, R. (2020). Better salinity tolerance in tetraploid vs diploid volkamer lemon seedlings is associated with robust antioxidant and osmotic adjustment mechanisms. *Journal of Plant Physiology*, 244(October 2019), 153071. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153071>
- Killiny, N., & Hijaz, F. (2016). Amino acids implicated in plant defense are higher in Candidatus Liberibacter asiaticus-tolerant citrus varieties. *Plant Signaling & Behavior*, 11(4). <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1171449>
- Killiny, N., Jones, S. E., Nehela, Y., Hijaz, F., Dutt, M., Gmitter, F. G., & Grosser, J. W. (2018). All roads lead to Rome: Towards understanding different avenues of tolerance to huanglongbing in citrus cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2018.05.005>
- Kinnersley, A. M., & Turano, F. J. (2010). Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and plant responses to stress. <https://doi.org/10.1080/07352680091139277>, 19(6), 479–509. <https://doi.org/10.1080/07352680091139277>
- Koh, E. J., Zhou, L., Williams, D. S., Park, J., Ding, N., Duan, Y. P., & Kang, B. H. (2012). Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*.” *Protoplasma*, 249(3), 687–697. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0312-3>
- Koh, J., Morales-Contreras, B. E., Guerra-Rosas, M. I., Osorio-Hernández, E., Culver, C. A., Morales-Castro, J., & Wicker, L. (2020). Huanglongbing disease and quality of pectin and fruit juice extracted from Valencia oranges. *LWT*, 131, 109692. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109692>
- Komorsky-Lovrić, Š., & Novak, I. (2011). Abrasive stripping square-wave voltammetry of blackberry, raspberry, strawberry, pomegranate, and sweet and blue potatoes. *Journal of Food Science*, 76(6). <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2011.02256.X>
- Krishnamurthy, A., & Rathinasabapathi, B. (2013). Oxidative stress tolerance in plants: novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 8(10), doi: 10.4161/psb.25761. <https://doi.org/10.4161/psb.25761>
- Kumar, N., Kiran, F., & Etxeberria, E. (2018). Huanglongbing-induced anatomical changes in citrus fibrous root orders. *HortScience*, 53(6), 829–837. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12390-17>



- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, Vol. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Küpper, H., & Andresen, E. (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 8(3), 269–285. <https://doi.org/10.1039/C5MT00244C>
- Langfelder, P., & Horvath, S. (2008). WGCNA: An R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-559/FIGURES/4>
- Lanier, C., Bernard, F., Dumez, S., Leclercq-Dransart, J., Lemièrre, S., Vandebulcke, F., ... Deram, A. (2019). Combined toxic effects and DNA damage to two plant species exposed to binary metal mixtures (Cd/Pb). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 278–287. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.10.010>
- Léchaudel, M., Lopez-Lauri, F., Vidal, V., Sallanon, H., & Joas, J. (2013). Response of the physiological parameters of mango fruit (transpiration, water relations and antioxidant system) to its light and temperature environment. *Journal of Plant Physiology*, 170(6), 567–576. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.11.009>
- Li, J., Li, L., Pang, Z., Kolbasov, V. G., Ehsani, R., Carter, E. W., & Wang, N. (2019). Developing citrus huanglongbing (HLB) management strategies based on the severity of symptoms in HLB-endemic citrus-producing regions. *Phytopathology*, 109(4), 582–592. [https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0287-R/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-08-18-0287-R\\_T4.JPEG](https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0287-R/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-08-18-0287-R_T4.JPEG)
- Li, L., Rowbotham, J. S., Christopher Greenwell, H., & Dyer, P. W. (2013). An introduction to pyrolysis and catalytic pyrolysis: versatile techniques for biomass conversion. In *New and Future Developments in Catalysis: Catalytic Biomass Conversion* (pp. 173–208). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53878-9.00009-6>
- Li, S., Wu, F., Duan, Y., Singerman, A., & Guan, Z. (2020). Citrus greening: Management strategies and their economic impact. *HortScience*, 55(5), 604–612. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14696-19>
- Li, W., Hartung, J. S., & Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1), 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>
- Li, W., Levy, L., & Hartung, J. S. (2009). Quantitative distribution of “*Candidatus liberibacter asiaticus*” in citrus plants with citrus Huanglongbing. *Phytopathology*, 99(2), 139–144. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-2-0139>

- Lin, K.-H. (1956). Etiological studies of yellow shoot of Citrus[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2((1)), 13–42.
- Liu, J., Li, J., Su, X., & Xia, Z. (2014). Grafting improves drought tolerance by regulating antioxidant enzyme activities and stress-responsive gene expression in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, 107, 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.012>
- Liu, S., Wu, J., Zhang, P., Hasi, G., Huang, Y., Lu, J., & Zhang, Y. (2016). Response of phytohormones and correlation of SAR signal pathway genes to the different resistance levels of grapevine against *Plasmopara viticola* infection. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 56–66. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2016.05.020>
- Liu, X., Zheng, Y., Wang-Pruski, G., Gan, Y., Zhang, B., Hu, Q., ... Liu, L. (2019). Transcriptome profiling of periwinkle infected with Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*). *European Journal of Plant Pathology*, 153(3), 891–906. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01607-9>
- Lopes, S A; Massari, C. A.; Barbosa, J. C.; Ayres, A. J. (2007). Huanglongbing in the State of São Paulo - Brazil: Current situation, regulation, management and economic impact. 1–6.
- Lourkisti, R., Froelicher, Y., Herbette, S., Morillon, R., Giannettini, J., Berti, L., & Santini, J. (2021). Triploidy in Citrus genotypes improves leaf gas exchange and antioxidant recovery from water deficit. *Frontiers in Plant Science*, 11, 2311. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.615335>
- Lourkisti, R., Froelicher, Y., Herbette, S., Morillon, R., Tomi, F., Gibernau, M., ... Santini, J. (2020). Triploid Citrus genotypes have a better tolerance to natural chilling conditions of photosynthetic capacities and specific leaf volatile organic compounds. *Frontiers in Plant Science*, 11, 330. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00330>
- Lourkisti, R., Oustric, J., Quilichini, Y., Froelicher, Y., Herbette, S., Morillon, R., ... Santini, J. (2021). Improved response of triploid citrus varieties to water deficit is related to anatomical and cytological properties. *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.041>
- Luna, C., Garcia Seffino, L., Arias, C., & Taleisnik, E. (2000). Oxidative stress indicators as selection tools for salt tolerance in *Chloris gayana*. *Plant Breeding*, 119(4), 341–345. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00504.x>
- Luro, F., Curk, F., Froelicher, Y., & Ollitrault, P. (2018). Recent insights on Citrus diversity and phylogeny. In *AGRUMED: Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean*. <https://doi.org/10.4000/books.pcyj.2169>

- Luro, François, Bloquel, E., Tomu, B., Costantino, G., Tur, I., Riolacci, S., ... Pailly, O. (2017). The INRA-CIRAD citrus germplasm collection of San Giuliano, Corsica. In *AGRUMED: Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean: Acclimatization, diversifications, uses [en ligne]*. <https://doi.org/10.4000/books.pcjb.2232>
- Mable, B. K., Alexandrou, M. A., & Taylor, M. I. (2011, July). Genome duplication in amphibians and fish: An extended synthesis. *Journal of Zoology*, Vol. 284, pp. 151–182. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2011.00829.x>
- Maere, S., Heymans, K., & Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(16), 3448–3449. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTI551>
- Mao, G., Seebeck, T., Schrenker, D., & Yu, O. (2013). CYP709B3, a cytochrome P450 monooxygenase gene involved in salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-169>
- Martinelli, F., Reagan, R. L., Dolan, D., Fileccia, V., & Dandekar, A. M. (2016). Proteomic analysis highlights the role of detoxification pathways in increased tolerance to Huanglongbing disease. *BMC Plant Biology*, 16(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0858-5>
- Masterson, J. (1994). Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 264(5157), 421 LP – 424. <https://doi.org/10.1126/science.264.5157.421>
- McClellan, A. P. D., & Oberholzer, P. C. J. (1965). Greening disease of the sweet orange: evidence that is caused by a transmissible virus. *South African Journal of Agricultural Science*, 8, 253–276.
- McCormack, M. L., Dickie, I. A., Eissenstat, D. M., Fahey, T. J., Fernandez, C. W., Guo, D., ... Zadworny, M. (2015). Tansley review Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytologist*, (207), 505–518. <https://doi.org/10.1111/nph.13363>
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P., & Michelmore, R. W. (2006, April 26). Plant NBS-LRR proteins: Adaptable guards. *Genome Biology*, Vol. 7, p. 212. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-4-212>
- Mead, F. W. (2017, December). Asian citrus psyllid - *Diaphorina citri* Kuwayama. Retrieved March 25, 2021, from IFAS - University of Florida website: <http://entnemdept.ufl.edu/creatures/citrus/acpsyllid.htm>

- Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., & Michelmore, R. W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *15*(4), 809–834. <https://doi.org/10.1105/tpc.009308>
- Mhamdi, A., Noctor, G., & Baker, A. (2012). Plant catalases: Peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *525*(2), 181–194. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2012.04.015>
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>
- Miles, G. P., Stover, E., Ramadugu, C., Keremane, M. L., & Lee, R. F. (2017). Apparent tolerance to Huanglongbing in Citrus and Citrus-related germplasm. *HortScience*, *52*(1), 31–39. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11374-16>
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, *7*(9), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Mohnen, D. (2008, June). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 11, pp. 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- Mouhaya, W., Allario, T., Brumos, J., Andrés, F., Froelicher, Y., Luro, F., ... Morillon, R. (2010). Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Functional Plant Biology*, *37*(7), 674. <https://doi.org/10.1071/FP10035>
- Mullineaux, P. M., & Rausch, T. (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research*, *86*(3), 459–474. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-8811-8>
- Nazir, F., Hussain, A., & Fariduddin, Q. (2019). Hydrogen peroxide modulate photosynthesis and antioxidant systems in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants under copper stress. *Chemosphere*, *230*, 544–558. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.05.001>
- Nebenführ, A., & Staehelin, L. A. (2001). Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends in Plant Science*, *6*(4), 160–167. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(01\)01891-x](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(01)01891-x)
- Nehela, Y., Hijaz, F., Elzaawely, A. A., El-Zahaby, H. M., & Killiny, N. (2018). Citrus phytohormonal response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* and its vector *Diaphorina citri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *102*, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.11.004>
- Neupane, D., & Moss, C. B. (2016). Estimating Citrus Production Loss due to Citrus Huanglongbing in Florida Estimating Citrus Production Loss Due to Citrus Huanglongbing in Florida. 6–9.

- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Oliveira, T. M., Yahmed, J. Ben, Dutra, J., Maserti, B. E., Talon, M., Navarro, L., ... Morillon, R. (2017). Better tolerance to water deficit in doubled diploid ‘Carrizo citrange’ compared to diploid seedlings is associated with more limited water consumption. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(9). <https://doi.org/10.1007/S11738-017-2497-3>
- Ollitrault, P., Desmaret, P., & Griffon, M. (2000). Les agrumes. *Comptes Rendus Des Séances de l’Académie d’Agriculture de France*, 86(8), 189–275.
- Ollitrault, P., & Navarro, L. (2012). Citrus. In *Handbook of Plant Breeding* (Vol. 8, pp. 623–662). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_16)
- Otto, S. P., & Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, Vol. 34, pp. 401–437. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.401>
- Oustric, J. (2017). *DOCTEUR EN ASPECTS MOLECULAIRES ET Mention : Biochimie et Biologie Moléculaire*.
- Oustric, J., Morillon, R., Luro, F., Herbette, S., Lourkisti, R., Giannettini, J., ... Santini, J. (2017). Tetraploid Carrizo citrange rootstock (*Citrus sinensis* Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) enhances natural chilling stress tolerance of common clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan). *Journal of Plant Physiology*, 214, 108–115. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2017.04.014>
- Oustric, J., Quilichini, Y., Morillon, R., Herbette, S., Luro, F., Giannettini, J., ... Santini, J. (2019). Tetraploid citrus seedlings subjected to long-term nutrient deficiency are less affected at the ultrastructural, physiological and biochemical levels than diploid ones. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 372–384. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2018.12.020>
- Padoan, D., Mossad, A., Chiancone, B., Germana, M. A., & Khan, P. S. S. V. (2013). Ploidy levels in Citrus clementine affects leaf morphology, stomatal density and water content. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(4), 283–290. <https://doi.org/10.1590/s2197-00252013000400006>
- Palmeira-Mello, M. V., Souza, J. L., Pérez, A. F., Cavalcanti, A. dos S., Kahn, S. A., Passe-Coutrin, N., ... Cebrián-Torrejón, G. (2021). Insights of Tris(2-pyridylmethyl)amine as anti-tumor agent for osteosarcoma: experimental and in silico studies. *Journal of Molecular Structure*, 1228, 129773. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2020.129773>
- Parent, C., Capelli, N., & Dat, J. (2008). Formes réactives de l’oxygène, stress et mort cellulaire

- chez les plantes. *Comptes Rendus Biologies*, 331(4), 255–261.  
<https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2008.02.001>
- Park, C. J., Caddell, D. F., & Ronald, P. C. (2012). Protein phosphorylation in plant immunity: insights into the regulation of pattern recognition receptor-mediated signaling. *Frontiers in Plant Science*, 3(AUG). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2012.00177>
- Park, J. W., Louzada, E. S., Braswell, W. E., Stansly, P. A., da Graça, J. V., McCollum, G., ... Kunta, M. (2018). A new diagnostic real-time PCR method for huanglongbing detection in citrus root tissue. *Journal of General Plant Pathology*, 84(5), 359–367.  
<https://doi.org/10.1007/S10327-018-0793-4/FIGURES/5>
- Patrick Ollitrault, Camille Jacquemond, C. D. and F. L. (2003). *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*. <https://doi.org/10.1201/9781482280043-10>
- Penella, C., Nebauer, S. G., Quiñones, A., San Bautista, A., López-Galarza, S., & Calatayud, A. (2015). Some rootstocks improve pepper tolerance to mild salinity through ionic regulation. *Plant Science*, 230, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.10.007>
- Pervaiz, T., Amjid, M. W., El-Kereamy, A., Niu, S. H., & Wu, H. X. (2022). MicroRNA and cDNA-Microarray as potential targets against abiotic stress response in plants: Advances and prospects. *Agronomy*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/agronomy12010011>
- Pfister, B., & Zeeman, S. C. (2016). Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(14), 2781–2807. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2250-x>
- Pospíšil, P., & Prasad, A. (2014). Formation of singlet oxygen and protection against its oxidative damage in Photosystem II under abiotic stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.025>
- Poveda, J. (2020). Use of plant-defense hormones against pathogen-diseases of postharvest fresh produce. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 111, 101521.  
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101521>
- Ramadugu, C. (2019). Novel citrus hybrids with HLB resistance.
- Ramadugu, C., Keremane, M. L., Halbert, S. E., Duan, Y. P., Roose, M. L., Stover, E., & Lee, R. F. (2016). Long-term field evaluation reveals huanglongbing resistance in Citrus relatives. *Plant Disease*, 100(9), 1858–1869. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0271-RE>
- Ramanna, M. S., & Jacobsen, E. (2003). Relevance of sexual polyploidization for crop improvement - A review. *Euphytica*, 133(1), 3–18.  
<https://doi.org/10.1023/A:1025600824483>
- Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Xu, B., Bose, J., Kaur, S., Conn, V., ... Gilliam, M. (2015).

- GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters. *Nature Communications* 2015 6:1, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms8879>
- Ramsey, J., & Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 467–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467>
- Rao, X., & Dixon, R. A. (2017). Brassinosteroid mediated cell wall remodeling in grasses under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00806>
- Rawat, N., Kumar, B., Albrecht, U., Du, D., Huang, M., Yu, Q., ... Deng, Z. (2017). Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. *Horticulture Research*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.64>
- Renger, G. (2007). Primary processes of photosynthesis: Principles and apparatus, 2 Parts. Cambridge: Royal Society of Chemistry Publishers.
- Rewald, B., Meinen, C., Trockenbrodt, M., Ephrath, J. E., & Rachmilevitch, S. (2012). Root taxa identification in plant mixtures - current techniques and future challenges. *Plant and Soil*, 359(1–2), 165–182. <https://doi.org/10.1007/S11104-012-1164-0/TABLES/2>
- Richardson, M. L., & Hall, D. G. (2013). Resistance of *Poncirus* and *Citrus* × *Poncirus* germplasm to the asian citrus psyllid. *Crop Science*, 53(1), 183–188. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.02.0091>
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., & Lê Cao, K. A. (2017). mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Computational Biology*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005752>
- Rosales, R., & Burns, J. K. (2011). Phytohormone changes and carbohydrate status in sweet orange fruit from Huanglongbing-infected trees. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30, 312–321. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9193-0>
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., ... Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2479. <https://doi.org/10.3390/ijms20102479>
- Ruiz, M., Oustric, J., Santini, J., & Morillon, R. (2020, November 5). Synthetic polyploidy in grafted crops. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.540894>
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop

- plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAY2016), 571.  
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00571/BIBTEX>
- Saleh, B., Allario, T., Dambier, D., Ollitrault, P., & Morillon, R. (2008). Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(9), 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.06.007>
- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., & Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants 2021*, Vol. 10, Page 118, 10(1), 118. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10010118>
- Schneider, H. (1968). Anatomy of greening-diseased sweet orange shoots. In *Phytopathology* (Vol. 58, pp. 1155–1160).
- Seifert, G. J., & Blaukopf, C. (2010). Focus issue on plant cell walls: Irritable walls: The plant extracellular matrix and signaling. *Plant Physiology*, 153(2), 467. <https://doi.org/10.1104/PP.110.153940>
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules24132452>
- Shokrollah, H., Abdullah, T. L., Sijam, K., & Abdullah, S. N. A. (2010). Ultrastructures of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and its damage in huanglongbing (HLB) infected citrus. *African Journal of Biotechnology*, 9(36), 5897–5901. <https://doi.org/10.4314/ajb.v9i36>
- Silva-Navas, J., Conesa, C. M., Saez, A., Navarro-Neila, S., Garcia-Mina, J. M., Zamarreño, A. M., ... Pozo, J. C. del. (2019). Role of cis-zeatin in root responses to phosphate starvation. *New Phytologist*, 224(1), 242–257. <https://doi.org/10.1111/NPH.16020>
- Sivager, G., Calvez, L., Bruyere, S., Boisne-noc, R., Brat, P., Gros, O., ... Morillon, R. (2021). Specific physiological and anatomical traits associated with polyploidy and better detoxification processes contribute to improved Huanglongbing tolerance of the Persian lime compared with the Mexican lime. *12(August)*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.685679>
- Sorgonà, A., Abenavoli, M. R., Gringeri, P. G., & Cacco, G. (2007). Comparing morphological plasticity of root orders in slow- and fast-growing citrus rootstocks supplied with different nitrate levels. *Annals of Botany*, 100(6), 1287–1296. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCM207>
- Stahelin, L. A. (2019). *cell wall | Description, Properties, Components, & Communication | Britannica*. Retrieved from <https://www.britannica.com/science/cell-wall-plant-anatomy>
- Stebbins, G. L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. London : Edward Arnold.



- Stone, B., & Clarke, A. (1992). No Title. *Chelustry and Biology of (1-3)- $\beta$ -D-Glucans*. Victoria, Australia: La Trobe University Press.
- Stover, E., & Castle, W. (2002). Citrus rootstock usage, characteristics, and selection in the Florida Indian River region. *HortTechnology*, 12(1), 143–147. <https://doi.org/10.21273/horttech.12.1.143>
- Suh, J. H., Tang, X., Zhang, Y., Gmitter, F. G. J., & Wang, Y. (2021). Metabolomic analysis provides new insight into tolerance of Huanglongbing in Citrus. *Frontiers in Plant Science*, 0, 1522. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.710598>
- Swingle, W. T., & Reece, P. C. (1997). The botany of Citrus and its wild relatives. In *The Citrus Industry*. Berkeley.
- Tabassum, T., Farooq, M., Ahmad, R., Zohaib, A., & Wahid, A. (2017). Seed priming and transgenerational drought memory improves tolerance against salt stress in bread wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.007>
- Taiz & Zeiger. (2002). *Plant Physiology, Third Edition*. Sinauer Associates, Inc.
- Tanaka, T. (1961). Citologia: Semi-centennial commemoration papers on Citrus studies.
- Tang, L., & Vashisth, T. (2020). New insight in Huanglongbing-associated mature fruit drop in citrus and its link to oxidative stress. *Scientia Horticulturae*, 265, 109246. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109246>
- Tania Santivañez C., Gustavo Mora Aguilera, Gabriel Díaz Padilla, José Isabel López Arrollo, P. V. H. (2013). Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe.
- Tayalé, A., & Parisod, C. (2013). Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. *Cytogenetic and Genome Research*, 140(2–4), 79–96. <https://doi.org/10.1159/000351318>
- Teixeira, D. D. C., Danet, J. L., Eveillard, S., Martins, E. C., De Jesus, W. C., Yamamoto, P. T., ... Bové, J. M. (2005). Citrus Huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the “Candidatus” Liberibacter species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes*, 19(3), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.11.002>
- Tomaseto, A. F., Marques, R. N., Fereres, A., Zanardi, O. Z., Volpe, H. X. L., Alquézar, B., ... Miranda, M. P. (2019). Orange jasmine as a trap crop to control *Diaphorina citri*. *Scientific Reports*, 9(1), 2070. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38597-5>
- Tripathy, B. C., & Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 7(12), 1621–1633.

<https://doi.org/10.4161/psb.22455>

- Tuladhar, P., Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Role of phenols and polyphenols in plant defense response to biotic and abiotic stresses. *Biocontrol Agents and Secondary Metabolites*, 419–441. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822919-4.00017-X>
- Uarrota, V. G., Moresco, R., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., Da Costa Nunes, E., De Oliveira Neubert, E., ... Maraschin, M. (2016). The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry*, 197, 737–746. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.025>
- USDA. (2021). Citrus: World markets and trade. *United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service, January*, 1–11.
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Science*, 151(1), 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00197-1)
- Vieira, D. D. S. S., Emiliani, G., Michelozzi, M., Centritto, M., Luro, F., Morillon, R., ... Maserti, B. (2016). Polyploidization alters constitutive content of volatile organic compounds (VOC) and improves membrane stability under water deficit in Volkamer lemon (*Citrus limonia* Osb.) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 126, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.02.010>
- Vogel, J. (2008). Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.002>
- Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., & Schols, H. A. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20(2), 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Wang, F., Liu, J., Zhou, L., Pan, G., Li, Z., Zaidi, S.-H.-R., & Cheng, F. (2016). Senescence-specific change in ROS scavenging enzyme activities and regulation of various SOD isozymes to ROS levels in psf mutant rice leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 248–261. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2016.10.005>
- Wang, J., Zhang, H., & Allen, R. D. (1999). Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant and Cell Physiology*, 40(7), 725–732. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029599>
- Wang, K., Singh, D., Zeng, Z., Coleman, S. J., Huang, Y., Savich, G. L., ... Liu, J. (2010). MapSplice: accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. *Nucleic Acids Research*, 38(18). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKQ622>

- Wang, Y., Zhou, L., Yu, X., Stover, E., Luo, F., & Duan, Y. (2016). Transcriptome profiling of huanglongbing (HLB) tolerant and susceptible citrus plants reveals the role of basal resistance in HLB tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7, 933. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00933>
- Webber, H. J. (1967). *The Citrus Industry* (D. Leon, Ed.). University of California.
- Weingart, H., Ullrich, H., Geider, K., & Völksch, B. (2007). The Role of Ethylene Production in Virulence of *Pseudomonas syringae* pvs. *glycinea* and *phaseolicola*. <Http://Dx.Doi.Org/10.1094/PHYTO.2001.91.5.511>, 91(5), 511–518. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.5.511>
- Weir, R. (2003). *Iron and zinc deficiencies in citrus*. Retrieved from [www.agric.nsw.gov.au](http://www.agric.nsw.gov.au)
- Weng, H., Lv, J., Cen, H., He, M., Zeng, Y., Hua, S., ... He, Y. (2018). Hyperspectral reflectance imaging combined with carbohydrate metabolism analysis for diagnosis of citrus Huanglongbing in different seasons and cultivars. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 275, 50–60. <https://doi.org/10.1016/J.SNB.2018.08.020>
- Westbrook, C. J., Hall, D. G., Stover, E., Duan, Y. P., & Lee, R. F. (2011). Colonization of Citrus and Citrusrelated germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *HortScience*, 46(7), 997–1005. <https://doi.org/10.21273/hortsci.46.7.997>
- Wituszyńska, W., & Karpiński, S. (2013). Programmed cell death as a response to high light, UV and drought stress in plants. 207–245. <https://doi.org/10.5772/53127>
- Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., ... Talon, M. (2018a). Genomics of the origin and evolution of *Citrus*. *Nature*, 554(7692), 311–316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>
- Xu, J., Wang, X. Y., & Guo, W. Z. (2015). The cytochrome P450 superfamily: Key players in plant development and defense. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(9), 1673–1686. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60980-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60980-1)
- Yan, Y., Wang, S., Wei, M., Gong, B., & Shi, Q. (2018). Effect of different rootstocks on the salt stress tolerance in watermelon seedlings. *Horticultural Plant Journal*, 4(6), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.003>
- Ye, J., Fang, L., Zheng, H., Zhang, Y., Chen, J., Zhang, Z., ... Wang, J. (2006). WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/NAR/GKL031>
- Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, W., Xiao, H., Lin, H., ... Jin, Y. (2007). Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), 585–590. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.01.022>