

L'utilisation de l'hybridation contrôlée et des marqueurs moléculaires pour la sélection et la création de nouveaux porte-greffes d'agrumes présentant une tolérance potentielle aux stress biotiques et abiotiques est une approche prometteuse.

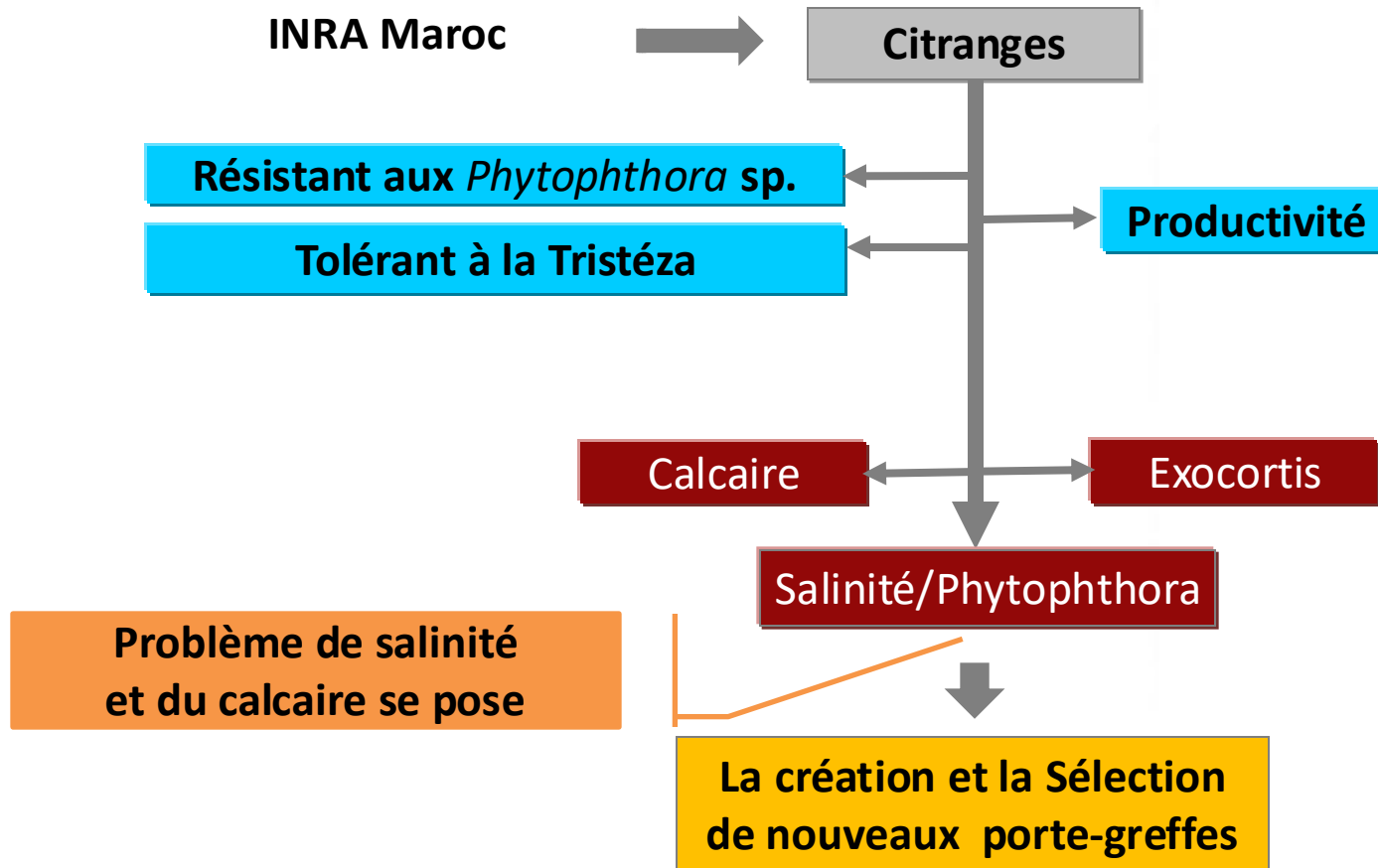
Présentée par:
Dr. Hamid BENYAHIA

Equipe: Talha Abdelhak, Chetto Ouïam, Omari Fatima Ezzahra, Beniken Lhou et Benaouda Hassan.

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité de Recherche Amélioration Génétique des Plantes et Conservation des Ressources Phytogénétiques




Introduction



Les voies de création de porte-greffes d'agrumes

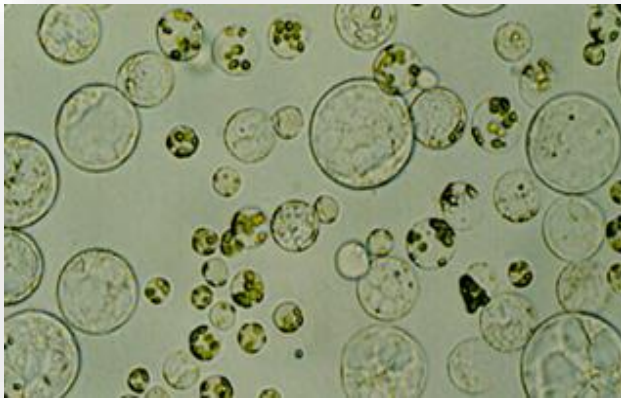
Un effort intense est donc consacré au niveau national pour développer de nouveaux porte-greffes à partir de croisements spécifiquement conçus en utilisant des approches conventionnelles et biotechnologiques, en particulier la pollinisation contrôlée et la fusion de protoplastes.



Amélioration génétique des
porte-greffes d'agrumes au
niveau de l'INRA Maroc



Fusion de protoplastes



Croisement dirigé



Hypothèse de Recherche

La tolérance à la salinité et à la tristezza et la résistance au Phytophthora sont des caractères polygéniques.

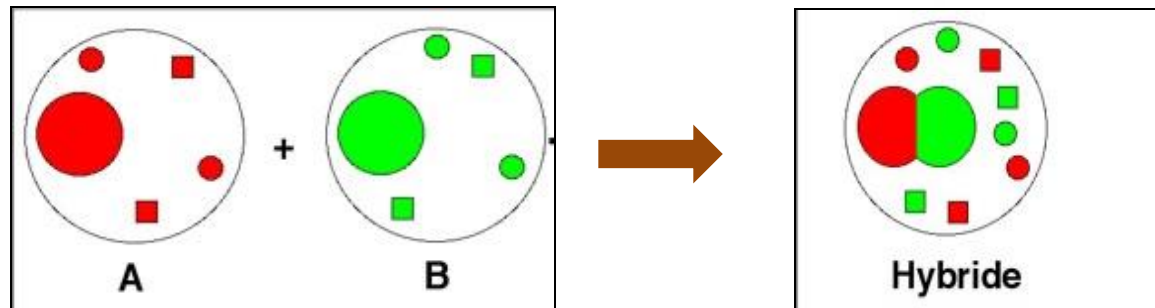
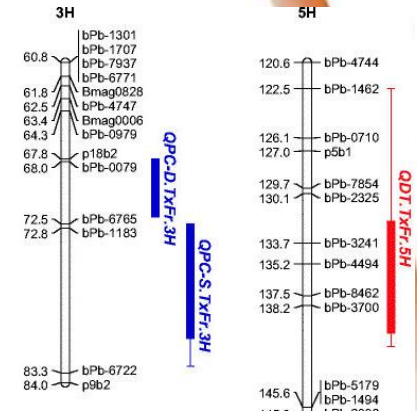


Aucun porte-greffe commercial n'associe l'ensemble des critères recherchés



Hypothèse

Les croisement dirigés pourraient permettre la recombinaison des facteurs génétiques responsables de la tolérance/résistance à ces trois contraintes chez un même génotype



Objectif















Partant de l'hypothèse du rôle que pourraient jouer les croisements dirigé comme technique d'amélioration de la résistance des porte-greffe d'agrumes à la salinité et au Phytophthora.

- **L'objectif principal est la vérification de telle hypothèse dans une perspective de développer de nouveaux porte-greffes hybrides capables de faire face à ces contraintes du verger National.**

Matériel et Méthodes

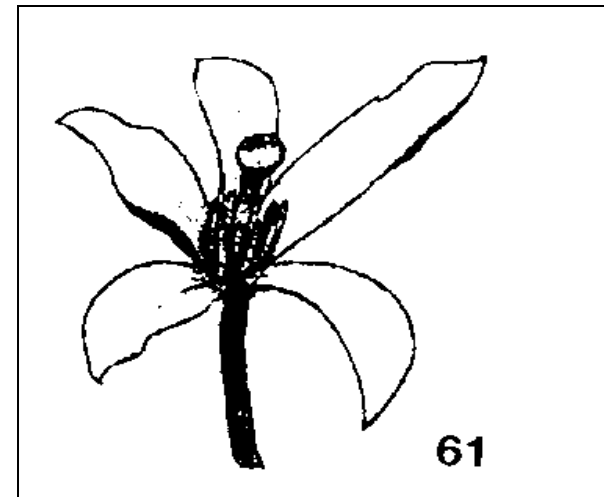
❏ Ce programme a impliqué **six géniteurs** qui ont été choisis à partir de différents groupes (mandariniers, pomélos...) pour leur **tolérance à la tristeza** d'abord et pour d'autres caractéristiques complémentaires telles que la tolérance à la salinité, le phytophthora et la qualité de la production

♀ \ ♂	 <i>C. parqisi x P. trjblata</i>	 <i>C. grandis</i>	 <i>C. suaki</i>	 <i>C. oshni</i>	 <i>C. limonia</i>	 <i>P. trjblata</i>
 <i>C. parqisi x P. trjblata</i>		X	X	X	X	X
 <i>C. grandis</i>	X		X	X	X	X
 <i>C. suaki</i>	X	X		X		X
 <i>C. oshni</i>	X	X	X		X	X
 <i>C. limonia</i>	X	X	X	X		X
 <i>P. trjblata</i>	X	X	X	X	X	

Matériel et Méthodes

☐ Pollinisation

- Collecte des fleur pour extraire les grains de pollens
- Des fleurs ouvertes à un stade de croissance de **61-62** sur l'échelle phénologique BBCH des agrumes sont choisis au hasard pour la collecte du pollen .



Matériel et Méthodes

❑ Préparation des grains de pollens

- ❖ Le pollen doit être recueilli lorsque les pétales commencent à s'ouvrir (mais avec des anthères fermés).
- ❖ Un déshydrateur (morceau de papier)



Placé à une Température ambiante pour 20-48 heures d'obscurité.



Ouverture des anthères



T°: 8 ° C
avec H.R: 70-80% pendant une heure



Boite de Petri avec graines de pollen libre

Déplacer les boîtes de Petri vers une chambre

Matériel et Méthodes

❑ Etapes de la pollinisation

❖ Emasculation et fixation des branches avec des fleurs



Choix des fleurs:

Fleurs de type simple au stade 59
Juste avant l'anthèse un jour avant
l'anthèse





Stade anthèse (fleurs témoins non immaculés)



Pollinisation



Saturation du stigmate avec les grains de pollen



Résultats

Récolte des fruits (7 mois AP)



Extraction des graines et semis



Elevage de nouveau portes greffes



Résultats

- ❖ La morphologie des feuilles a permis l'identification de 31 plantules d'origine zygotique;
- ❖ Ces plantules sont choisies pour la multiplication en masse par bouturage et la caractérisation moléculaire et physiologique vis-à-vis des contraintes biotiques et abiotiques.

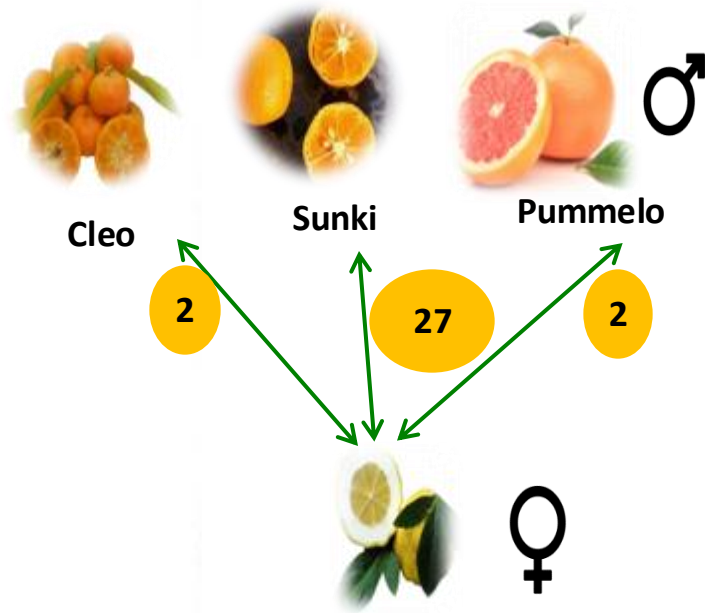
multiplication en masse par bouturage



Code de la plantule	Pedigree	Feuilles des parents		Feuilles de l'hybride
		Mâle	female	
H19	Mandarinier Cleopâtre (♂) x Citruselo Winter Haven (♀)			
H25	Mandarinier sunki (♂) x Citruselo Winter Haven (♀)			
H29	Mandarinier sunki (♂) x Citruselo Winter Haven (♀)			
H33	Mandarinier sunki (♂) x Citruselo Winter Haven (♀)			



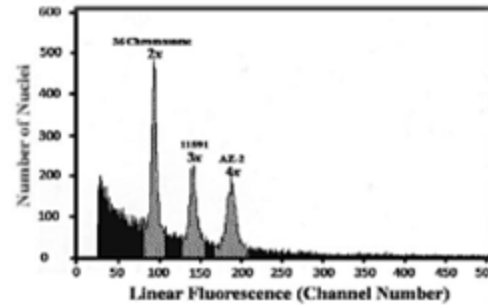
200 Plantules dont 31 zygotique



Résultats



Détermination du niveau de ploïdie par cytométrie en flux



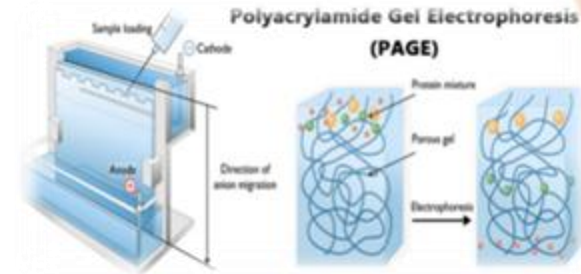
Extraction de l'ADN génomique (Doyle et Doyle, 1987)



Quantification par Nanodrop



Amplification par PCR



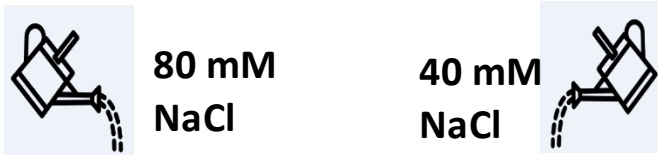
Révélation des fragments d'ADN par coloration au nitrate d'argent (Beidler et al., 1982)

Paires D'amorces

Locus	Séquence gauche (sens)	Séquence droite (anti-sens)	Motif répété	Tm (°C)
TAA15	GAAAGGGTTACTTGACCAGGC	CTTCCCAGCTGCACAAGC	TAA	45
TAA33	GGTACTGATAGTACTGCGGCG	GCTAATCGCTACGTCTTCGC	TAA	50

Résultats: Evaluation de la résistance des porte-greffes vis-à-vis de la salinité

- ❖ Des traitements de salinité ont été appliqués en serre en ajoutant du NaCl à la solution d'irrigation à 2 niveaux : 40 mM et 80 mM.



Split-Plot 3 répétitions;
Salinité en grand parcelle et génotype
en petite parcelle.

Blocks

TO PG1	T1 PG1	T2 PG1
TO PG1	T1 PG1	T2 PG1
TO PG2	T1 PG2	T2 PG2
TO PG2	T1 PG2	T2 PG2
TO PG3	T1 PG3	T2 PG3
TO PG3	T1 PG3	T2 PG3
TO PG4	T1 PG4	T2 PG4
TO PG4	T1 PG4	T2 PG4
TO PG5	T1 PG5	T2 PG5
TO PG5	T1 PG5	T2 PG5
TO PG6	T1 PG6	T2 PG6
TO PG6	T1 PG6	T2 PG6
TO PG7	T1 PG7	T2 PG7
TO PG7	T1 PG7	T2 PG7
TO PG8	T1 PG8	T2 PG8
TO PG8	T1 PG8	T2 PG8
TO PG9	T1 PG9	T2 PG9
TO PG9	T1 PG9	T2 PG9
TO PG10	T1 PG10	T2 PG10
TO PG10	T1 PG10	T2 PG10

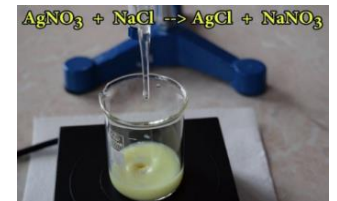
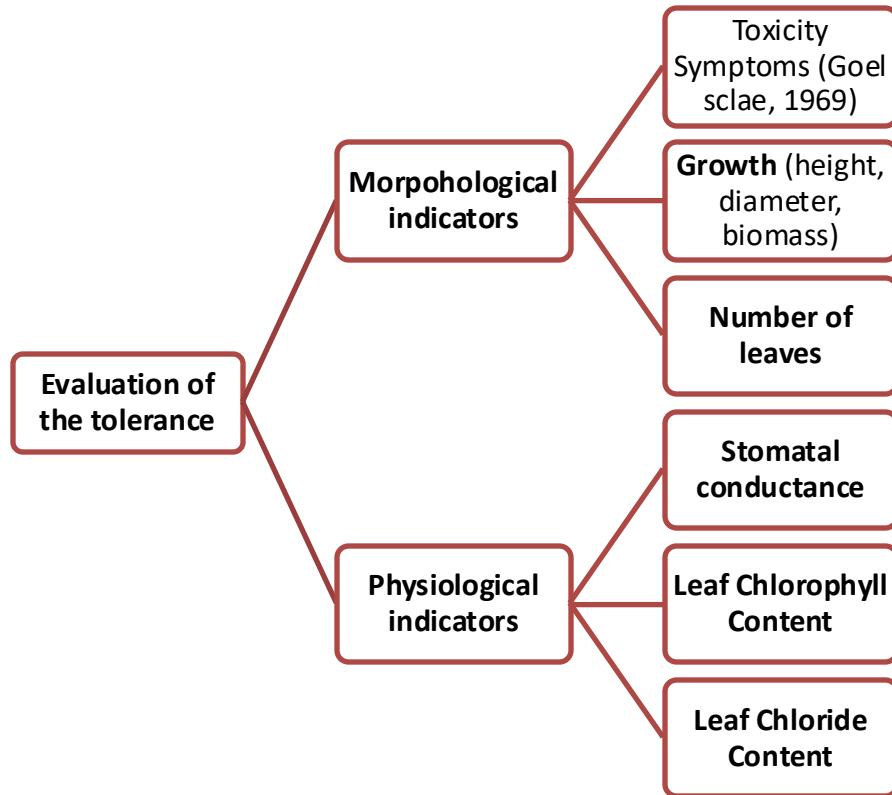


Traitement saline (0, 40, 80 mM NaCl)

Résultats: La tolérance à la salinité

❖ La tolérance à la salinité a été évaluée sur la base de différents indicateurs morphologiques, notamment:

- Sévérité des symptômes , la croissance des plantes et le nombre des feuilles;
- Des indicateurs physiologiques a savoir, la conductance stomatique, la teneur en chlorophylle et l'accumulation du chlorure au niveau des feuilles,



Résultats: Evaluation de la résistance des porte-greffes vis-à-vis de *Phytophthora citrophthora*

- ❖ L'isolat de *P. citrophthora* utilisé dans cette expérience a été récupéré du tronc d'un arbre infecté.
- ❖ La pathogénicité a été confirmée en inoculant les feuilles et les fruits de pomelo et de citron.

Phytophthora citrophthora



Résultats: Le test d'inoculation

- ❖ Le test d'inoculation a été réalisé au laboratoire sur des fragments de tiges issus des hybrides .



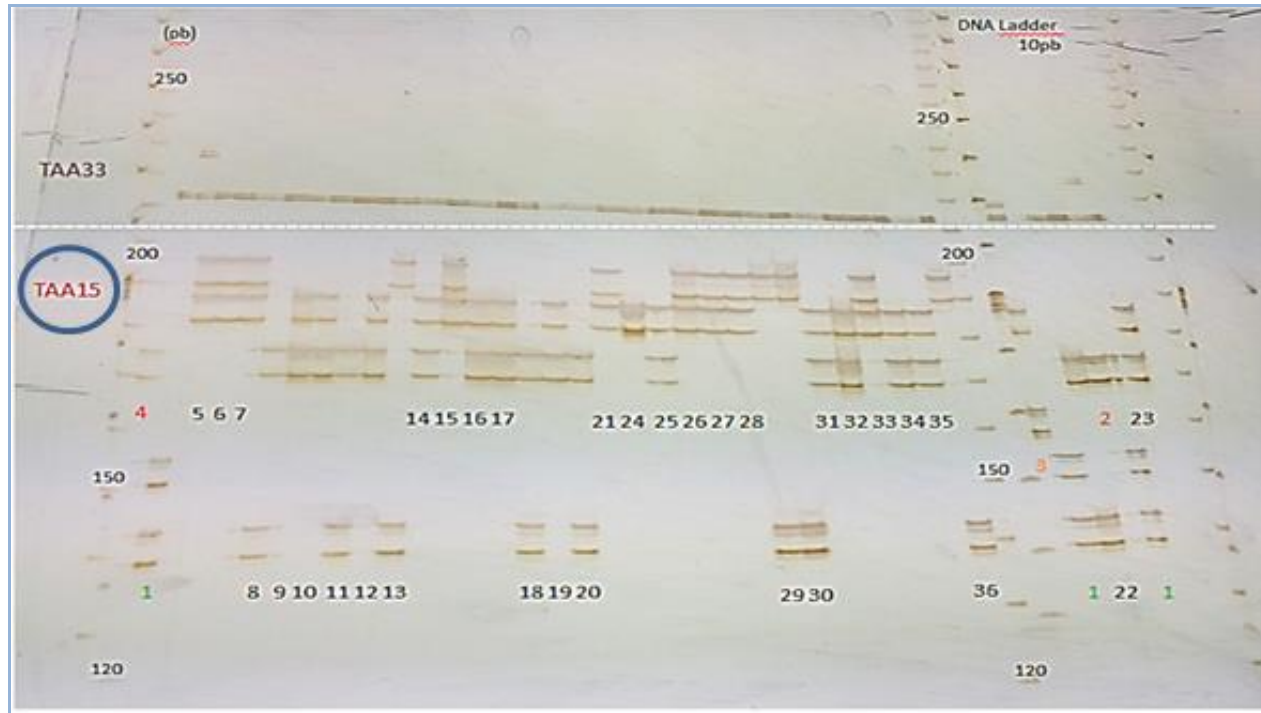
Phytophthora citrophthora



Mesure de la surface nécrosée

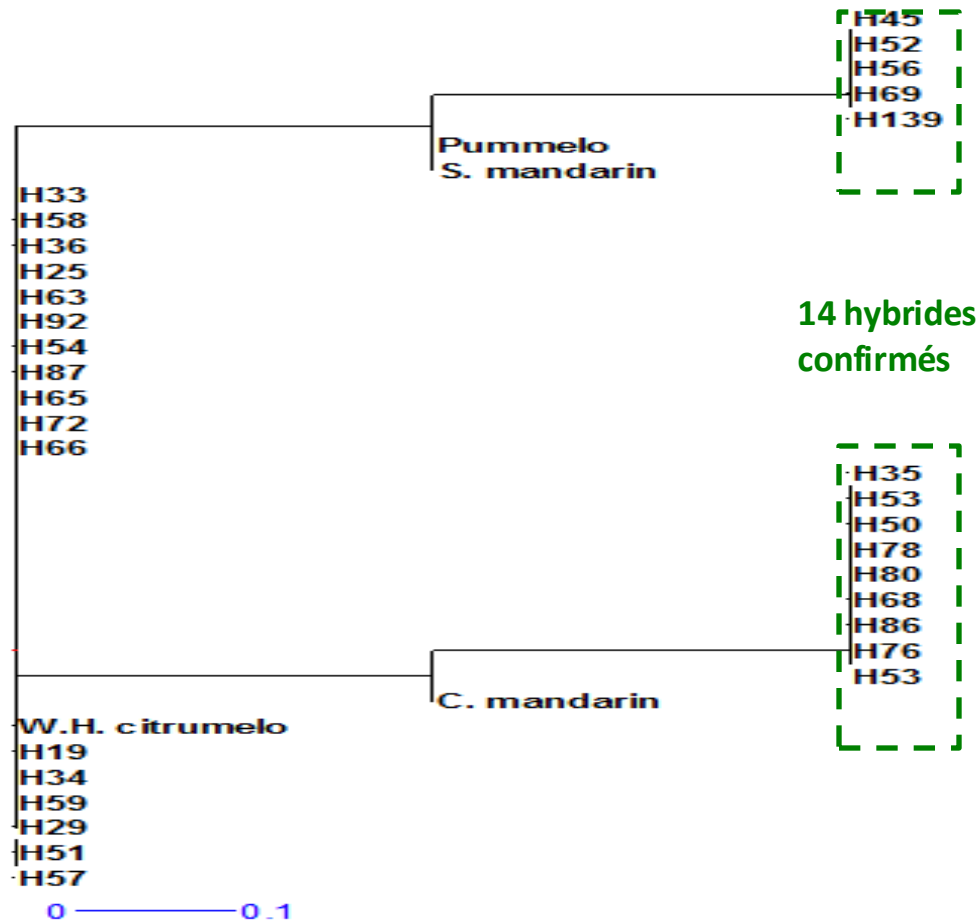
Résultats: Characterization moléculaire des porte-greffes

- ❖ L'analyse SSR (Simple Sequence Repeat) a montré un polymorphisme uniquement pour le locus TAA15.
- ❖ Cela signifie que ce locus présente des variations génétiques parmi les individus étudiés, ce qui peut être utile pour des études de diversité génétique ou de parenté.
- ❖ L'analyse de ségrégation de ce marqueur a révélé que toutes les plantes testées sont hétérozygotes à ce locus et ont des allèles en commun.



Résultats: Characterization moléculaire des porte-greffes

- ❖ La classification hiérarchique a confirmé l'origine parentale de 14 hybrides. Parmi ceux-ci, 9 hybrides proviennent de la mandarine cléopatra, tandis que 5 d'entre eux sont issus du pomelo ou de la mandarine sunki.

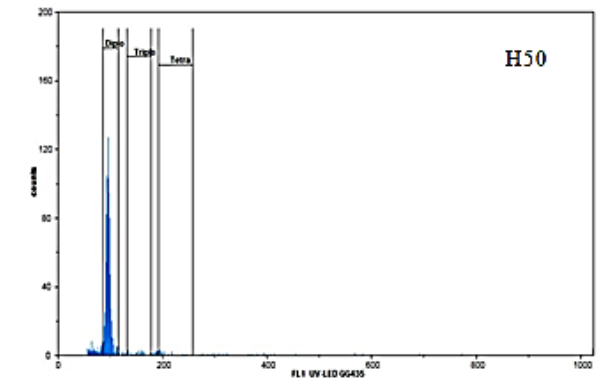
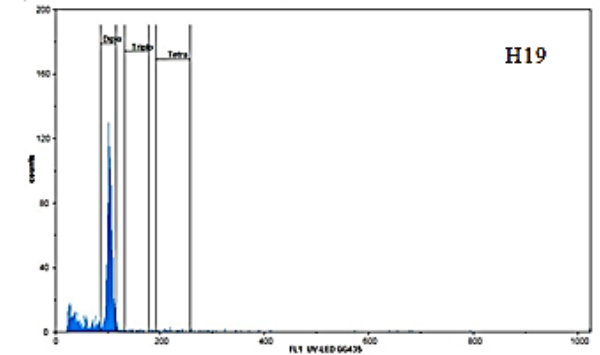
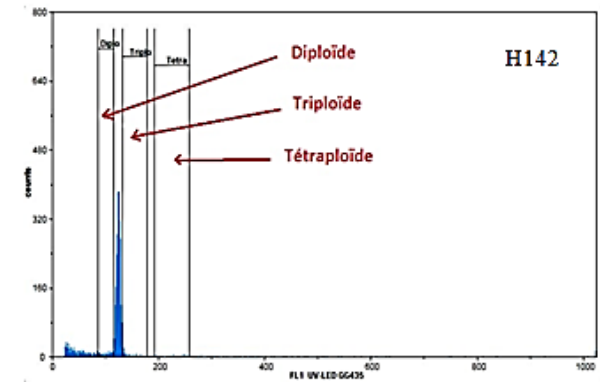


Résultats: Niveau de Ploïdie

Cymomètre en flux



Niveau de ploïdie



Génotype	Fluorescence moyenne	Niveau de ploïdie
AYA (Témoin triploïde)	161,68	3n
H19	102,76	2n
H25	103,72	2n
H29	93,46	2n
H33	104,60	2n
H34	105,40	2n
H35	90,88	2n
H36	104,25	2n
H45	92,98	2n
H50	91,97	2n
H51	95,14	2n
H52	97,64	2n
H53	98,10	2n
H54	101,67	2n
H56	93,90	2n
H57	93,25	2n
H58	104,93	2n
H59	92,92	2n
H63	108,21	2n
H65	106,95	2n
H66	99,86	2n
H68	97,05	2n
H69	93,26	2n

Résultats: Evaluation de la résistance des porte-greffes vis-à-vis de la salinité

Tolérance des nouveaux hybrides vis-à-vis de la salinité

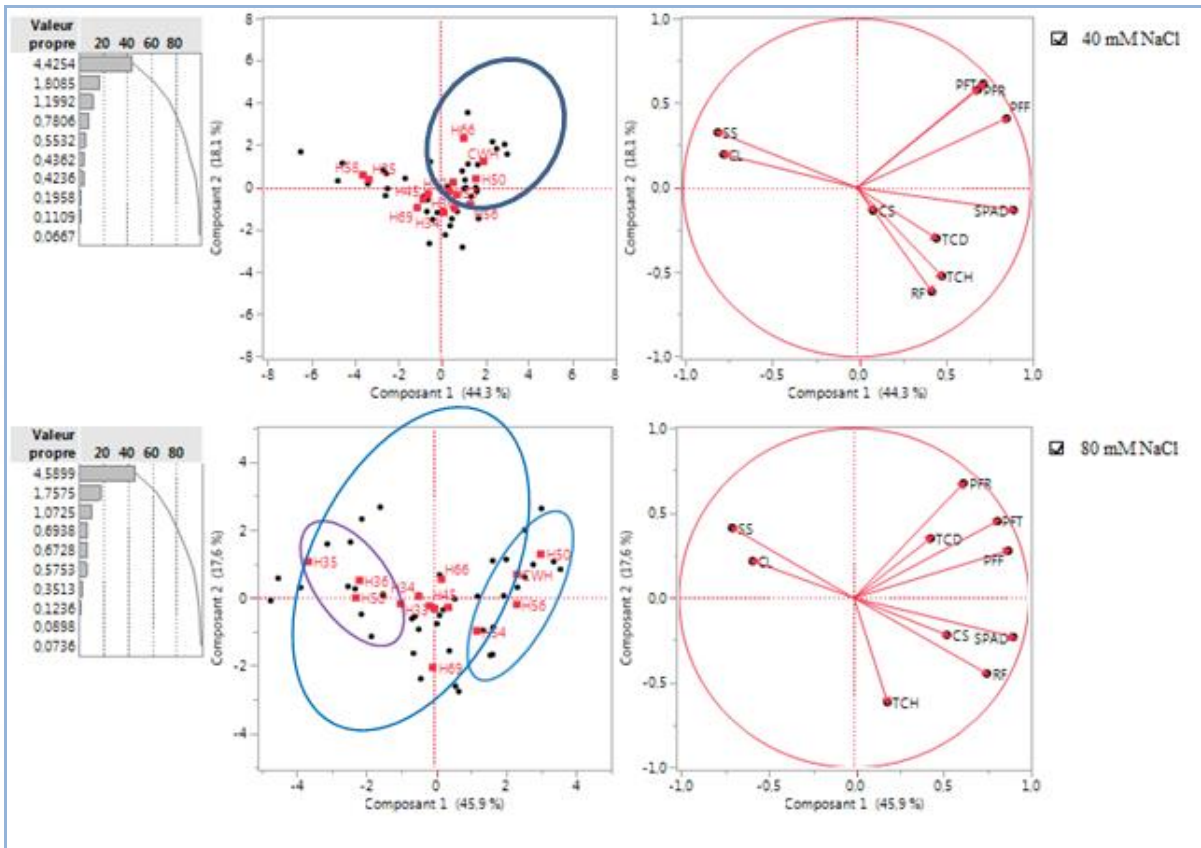
- ❖ Il y a un effet significatif de la salinité de l'eau d'irrigation sur toutes les réponses morpho-physiologiques des hybrides à la salinité, à l'exception du poids frais et du poids.

Paramètre	Source de variation	DL	Carré moyen	F	Pr > F
Taux de croissance en hauteur	T	2	20317,78086	37,76	< 0,0001
	G	13	1547,33388	2,88	0,0018
	T x G	26	686,42413	1,28	0,2023
Taux de croissance diamétrale	T	2	662,291983	4,69	0,0118
	G	13	441,796181	3,13	0,0008
	T x G	26	228,978070	1,62	0,0521
Indice de Sévérité des symptômes	T	2	45,1250000	35,86	< 0,0001
	G	13	9,3170024	7,40	< 0,0001
	T x G	26	1,3792735	1,10	0,3652
Conductance stomatique	T	2	257,8466667	27,20	< 0,0001
	G	13	44,3890430	4,68	< 0,0001
	T x G	26	16,2980128	1,72	0,0339
Indice de SPAD	T	2	3047,140139	33,65	< 0,0001
	G	13	734,010032	8,11	< 0,0001
	T x G	26	155,322788	1,72	0,0345
Poids frais des feuilles	T	2	2,8152562	0,76	0,4716
	G	13	46,0068294	12,40	< 0,0001
	T x G	26	5,1989508	1,40	0,1271
Poids frais de la tige	T	2	1,9016526	0,57	0,5672
	G	13	26,5574222	7,97	< 0,0001
	T x G	26	4,2736272	1,28	0,1971
Poids frais des racines	T	2	10,2990966	1,82	0,1689
	G	13	34,6662108	6,12	< 0,0001
	T x G	26	4,8474795	0,86	0,6652
Teneur des feuilles en chlorures	T	2	22956,89068	212,29	< 0,0001
	G	13	1135,63412	10,50	< 0,0001
	T x G	26	538,23301	4,98	< 0,0001



Résultats: Projection des variables et des génotypes étudiés sur le plan factoriel (1 x 2) de l'ACP

- ❖ Les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) ont révélé une meilleure capacité des hybrides **H50, H56, H92 et H54** ont toléré des concentrations croissantes de sel.



Accumulation de chlorure

Hybrid 56



13,7 µg/g de MS

Hybrid 58



65,32 µg/g de MS

Résultats: Evaluation de la résistance à *P. citrophthora*

- ❖ L'analyse de regroupement, prenant en compte tous les paramètres de résistance mesurés, a identifié un groupe de 5 hybrides comme étant résistants. Ces hybrides incluent : **H52, H56, H45, H68 et H92.**

Tableau 38. Analyse de la variance pour les indicateurs de tolérance à la gommose.

Paramètre	DL	Somme des carrés	Carré moyen	F	Pr < F
Longueur de la lésion au niveau de la tige (3 jours AI)	18	1044,939448	58,052192	7,50	<0,0001
Surface nécrosée de la feuille (2 jrs AI)	18	190,2480371	10,5693354	6,30	<0,0001
Surface nécrosée de la feuille (3 jours AI)	18	457,9820993	25,4434500	6,63	<0,0001
Proportion nécrosée de la feuille (3 jours AI)	18	33102,27707	1839,01539	12,67	<0,0001
Vitesse d'envahissement des tissus foliaires par le champignon (3 jours AI)	18	2020,052226	112,225124	4,37	<0,0001

Symptômes observés 2 jours

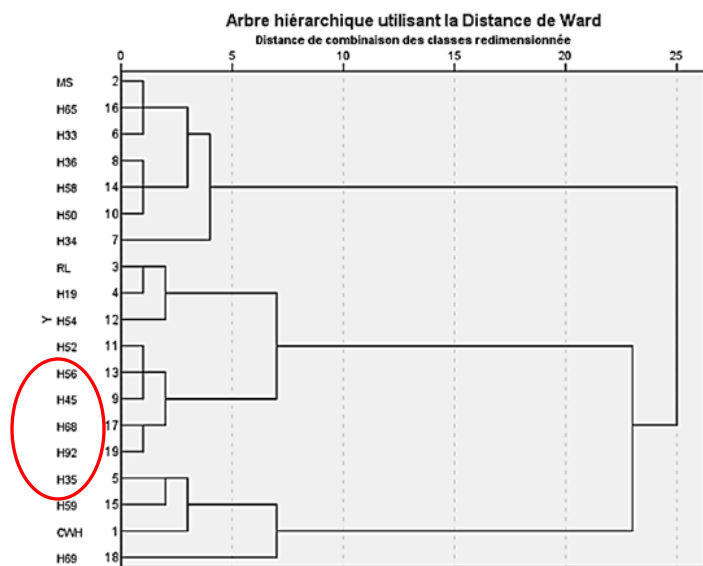


Figure 46. Classification hiérarchique multivariée des génotypes étudiés selon leur niveau de tolérance aux attaques de *P. citrophthora*.

Conclusions

Ce travail a abouti à l'identification de 14 plantes considérées comme des hybrides.

L'analyse du polymorphisme d'un locus SSR a aidé à identifier les origines parentales de ces Hybrides.

Deux hybrides confirmés combinant la tolérance au sel avec la résistance à *P. citrophthora* ont été identifiés : **H56 et H92**.



- ❁ Les porte-greffes sélectionnés (**H56, H92**) sont actuellement propagés par bouturage et greffage à l'INRA afin d'être testés ultérieurement comme porte-greffes dans des essais au champ multi-sites.
- ❁ Ces tests permettront de caractériser leur comportement dans les conditions locales des vergers, leur aptitude à la greffe et leur compatibilité avec les variétés commerciales.



Ces hybrides apparaissent comme des candidats prometteurs pour une utilisation dans les régions touchées par la salinité et les infections de *Phytophthora*, en remplacement du porte-greffe sensible au CTV, à savoir le bigaradier.

Conclusions

Fruits de nouveaux porte-greffes hybrides



Semences de nouveaux porte-greffes hybrides



Nouveaux porte-greffe avec des fruits (2024)



Nouveaux porte-greffes hybrides obtenus



Détermination du % de la polyembryonie



Préparation association V/PG

Installation des essais

