



Étude du potentiel de l'hybridation somatique pour améliorer la résistance des porte-greffes d'agrumes à *Phytophthora citrophthora*

Ouiam CHETTO, Pascal BARANTI, Patrick OLLITRAULT, Dominique DAMBIER, Hamid BENYAHIA

Le Secteur des Agrumes au Maroc – Un Pilier Socio-Économique

- Superficie cultivée d'environ 92 000 ha
- Production estimée en 2023/24 de 2,14 MT
- Source de devise : 3 à 6 MD/an
- Main d'œuvre 32 MJT
- Rendement moyen de 16 à 22 T/ha





Contraintes liées à la culture des agrumes

Contraintes abiotiques

- Salinité des sols et des eaux d'irrigation
- Sols calcaires

Contraintes biotiques

- Maladies dues à des virus
- Maladies cryptogamiques
- Maladies bactériennes
- Ravageurs
- Vieillessement des vergers

Changement climatique

- Pluviométrie irrégulière et déficitaire
- Fluctuations thermiques extrêmes

L'utilisation des porte-greffes en agrumiculture – avantages et importance

- 1 Réduction de la période juvénile
- 2 Optimisation génétique : Combine les meilleurs traits de la variété et du porte-greffe (qualité et rendement)
- 3 Authenticité des plantations
- 4 Résistance accrue : Améliore la tolérance aux stress biotiques et abiotiques
- 5 Adaptation aux conditions pédoclimatiques



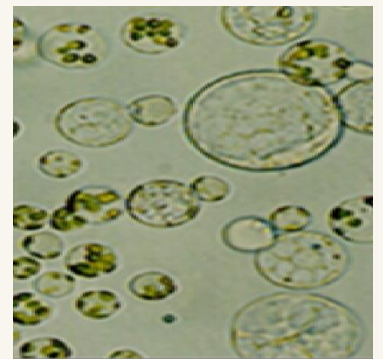
Voies d'Amélioration des Porte-Greffes

L'hybridation dirigée, bien qu'efficace, présente certaines limites :

- Polyembryonie
- Incompatibilité sexuelle
- Forte hétérozygotie

En revanche, l'hybridation somatique permet de:

- Dépasser les barrières sexuelles
- Créer de nouvelles combinaisons génétiques

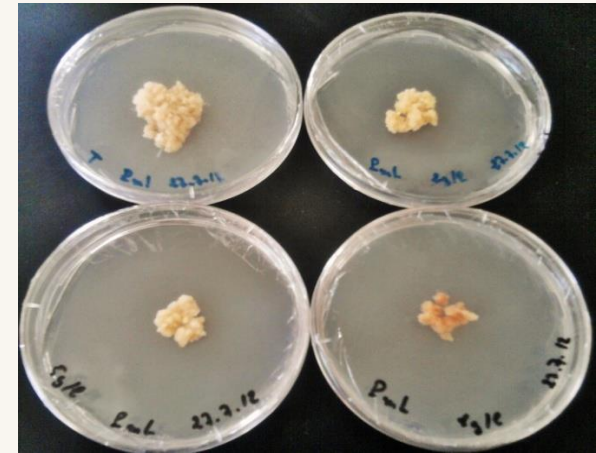




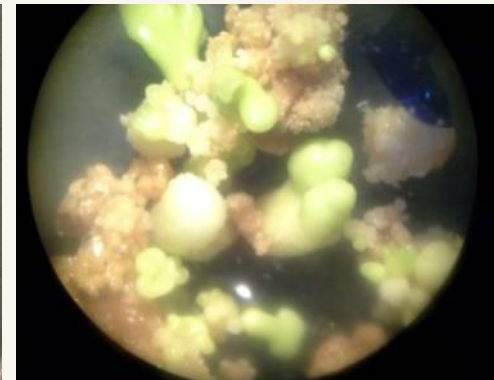
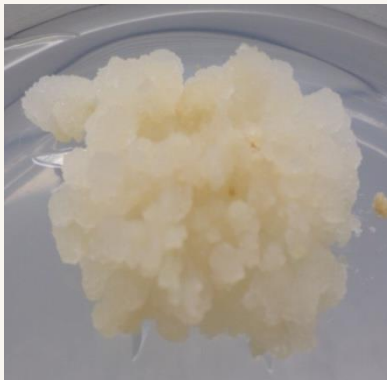
Objectif de l'Étude

- Création de nouveaux porte-greffes cybrides par hybridation somatique
- Evaluation de la résistance des cybrides aux stress induits par *Phytophthora citrophthora*

1. Mise en œuvre de tests de screening afin de sélectionner les génotypes présentant une résistance à la salinité et au *Phytophthora*

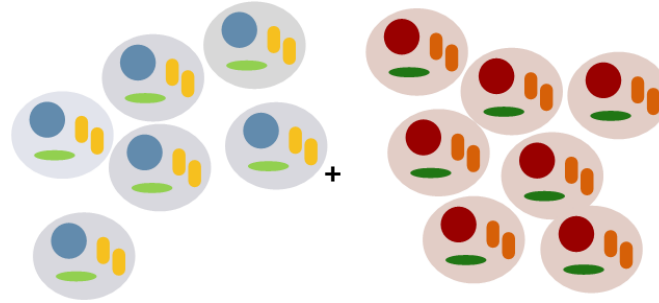


2. Mise au point d'un protocole efficace pour l'induction de cals friables embryogènes en vue de la régénération in vitro



Méthodologie pour la création de porte-greffes cybrides

Protoplastes du parent (A)
tolérant à la Tristeza et au
Phytophthora



Protoplastes du parent
(B) tolérant à la
salinité

Fusion des protoplastes

Noyau du parent (A)

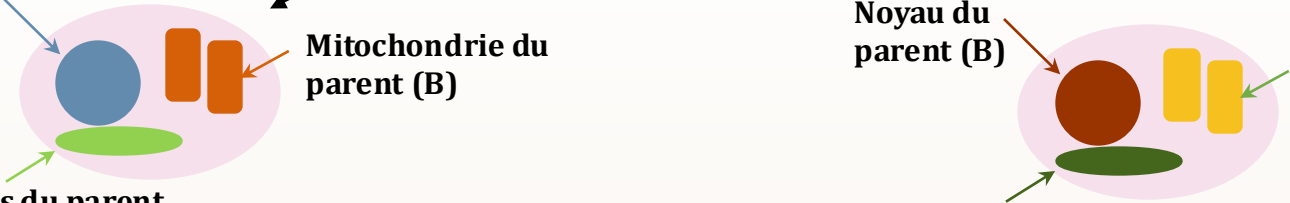
Chloroplastes du parent
(A) ou (B)

Mitochondrie du
parent (B)

Noyau du
parent (B)

Chloroplastes du parent
(A) ou (B)

Mitochondrie du
parent (A)



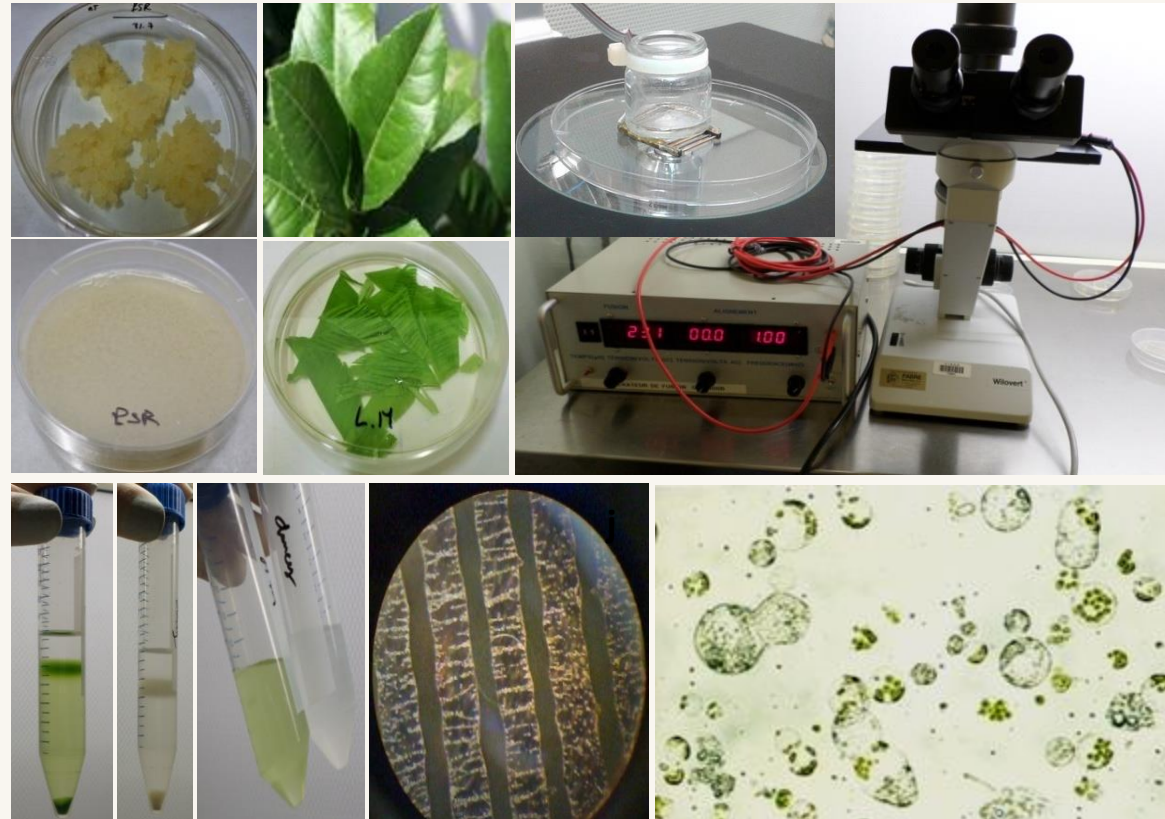
Création des génotypes cybrides par fusion des protoplastes

1. Isolation des Protoplastes :

- ✓ Matériel de Base: des cals friables et des feuilles
- ✓ Digestion Enzymatique
- ✓ Purification des Protoplastes
- ✓ Ajustement de la Densité

2. Fusion de protoplastes

3. Culture et régénération du produit de fusion



Régénération des plantes issues de fusion de protoplastes

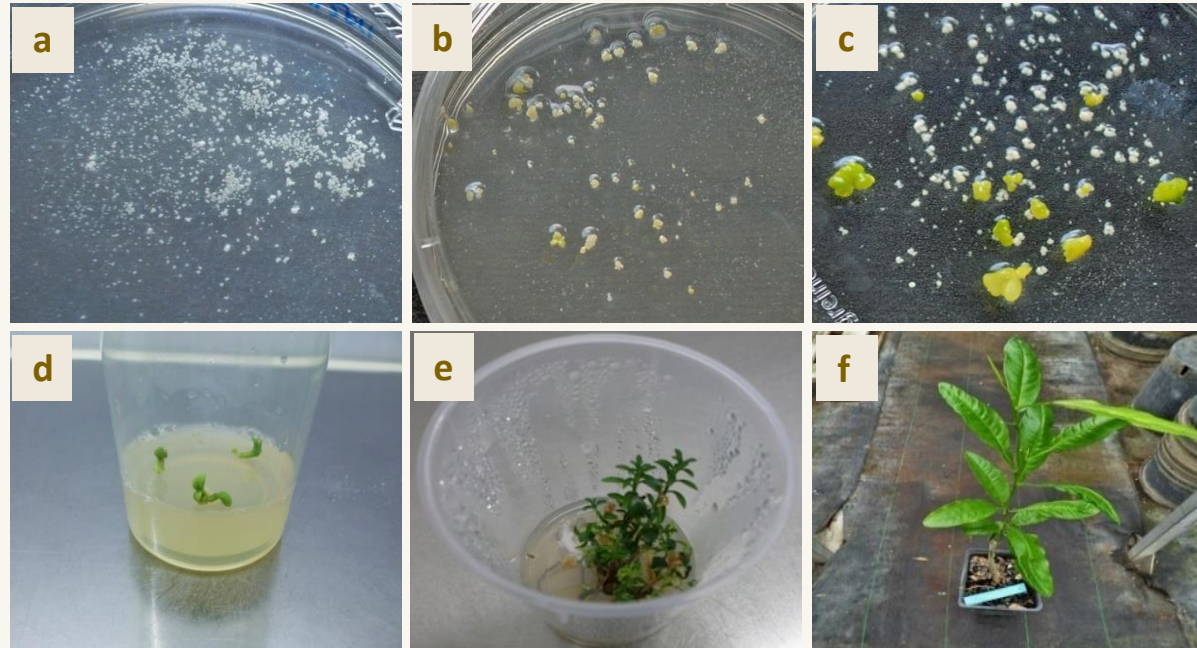
a : micro-cal formé à partir de protoplastes fusionnés

b : apparition de proembryons

c et d : développement et germination d'embryons somatiques

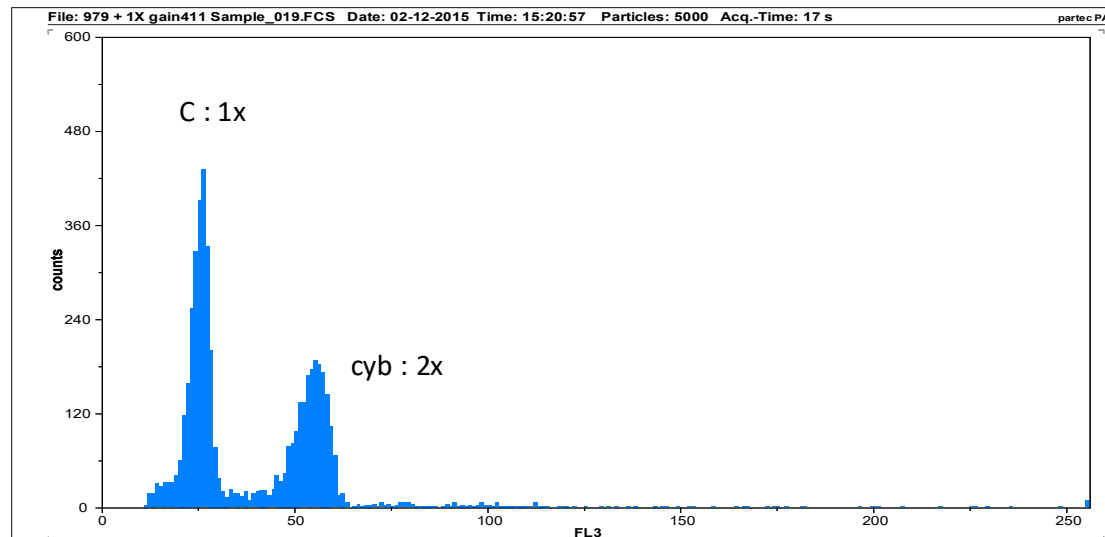
e : formation d'une plantule après germination de l'embryon

f : démarrage après greffage d'une plantule issue de fusion



Évaluation du niveau de ploïdie des génotypes régénérés

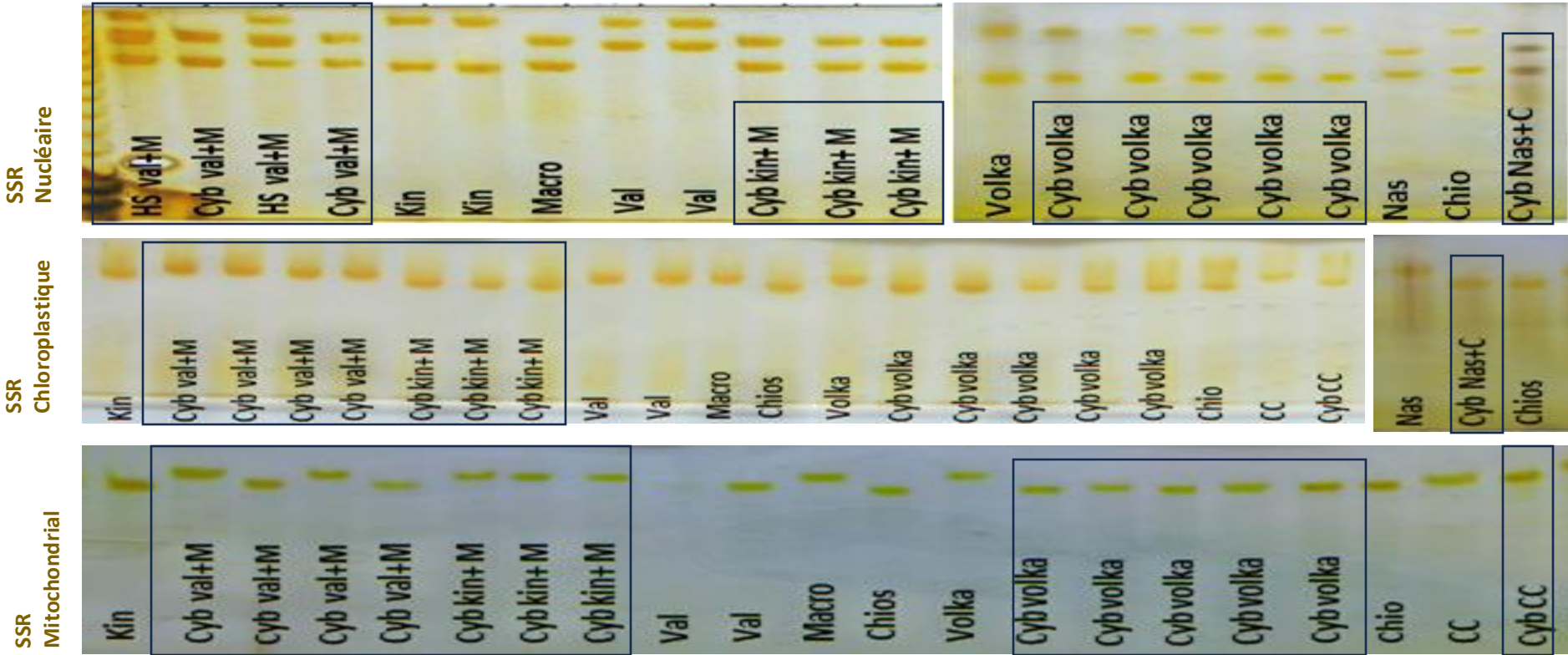
➔ Un total de 18 génotypes diploïdes ont été sélectionnés



Profils de cyrtométrie en flux : « C » contrôle (plante haploïde 1X) ;
« cyb : 2x » cybride diploïde de *Macrophylla*.

Caractérisation moléculaire par des marqueurs microsatellites

➔ Identification de 18 cybrides de porte-greffes



Profils de migration obtenus sur gel d'acrylamide après amplification par PCR en présence des couples d'amorces nucléaires de plantes issues de 5 combinaisons parentales.

Évaluation de la tolérance de différents cybrides au *Phytophthora citrophthora*

Cybrides

Code	Parents	Ploïdie	Mitochondries
Cyb H	lime Rangpur + Md. Chios	2x	« LR* »
Cyb F	lime Rangpur + Md. Chios	2x	« LR* »
Cyb 5	lime Rangpur + Md. Chios	2x	Chios
Cyb155	lime Rangpur + Md. Chios	2x	Chios
Cyb 979	Citrumelo 4475 + Md. Chios	2x	Chios
Cyb 971	Citrumelo 4475 + Md. Chios	2x	Chios
Cyb 23	Citrance C35 + Md. Chios	2x	Chios
Cyb 500	Citrandarin + Md. Chios	2x	Cléopâtre
Cyb 960	citrance Carrizo + Md. Chios	2x	Chios
Cyb 968	Volkameriana + Md. Chios	2x	Chios
Cyb 972a	Volkameriana + Md. Chios	2x	Chios
Cyb 983	Macrophylla + Md. Kinnow	2x	Kinnow
Cyb 984	Macrophylla + Md. Kinnow	2x	Kinnow
Cyb 985	Macrophylla + Md. Kinnow	2x	Kinnow
Cyb 981	Macrophylla + O. Valencia	2x	Orange
Cyb 980	Macrophylla + O. Valencia	2x	Orange
Cyb 972	Macrophylla + O. Valencia	2x	Orange
Cyb 979	Macrophylla + O. Valencia	2x	Orange

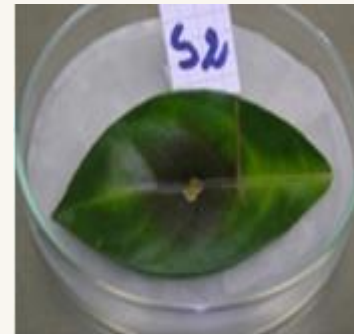
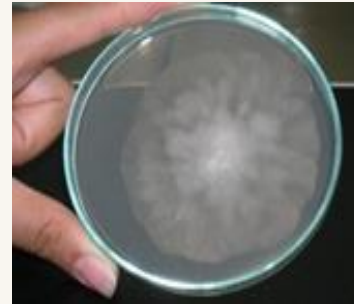
Parents impliqués dans les combinaisons

Parents	Nom scientifique	Ploïdie	Mitochondries
Lime Rangpur	<i>C. limonia</i> Osbeck	2x	LR
Citrumelo 4475	<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	2x	Pamplemousse
Citrance C35	<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>	2x	Orange
Citrandarin	<i>C. reticulata</i> x <i>P. trifoliata</i>	2x	Cléopâtre
Macrophylla	<i>C. macrophylla</i>	2x	Macrophylla
Volkameriana	<i>C. volkameriana</i>	2x	Volkameriana
Mandarine Kinnow	<i>C. nobilis</i> x <i>C. deliciosa</i>	2x	Kinnow
Orange Valencia	<i>C. sinensis</i> « Valencia »	2x	Orange
Citrance Carrizo	<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>	2x	Orange
Mandarine Chios	<i>C. deliciosa</i> Ten.	2x	Mandarine
Bigaradier	<i>C. aurantium</i>	2x	Bigaradier
Rough Lemon	<i>C. jambhiri</i>	2x	rough Lemon

Évaluation de la tolérance de différents cybrides au *Phytophthora citrophthora*

Méthode d'Inoculation des Feuilles Détachées

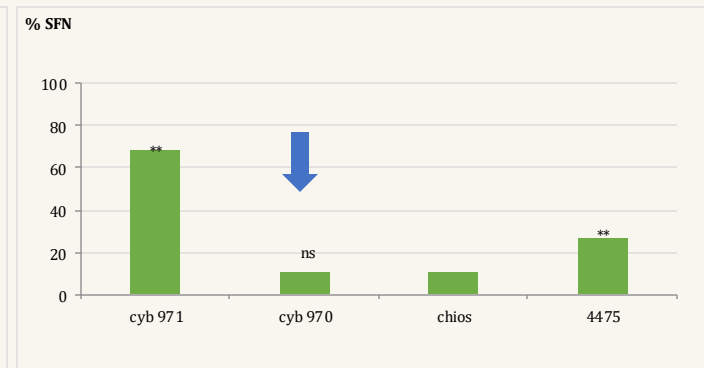
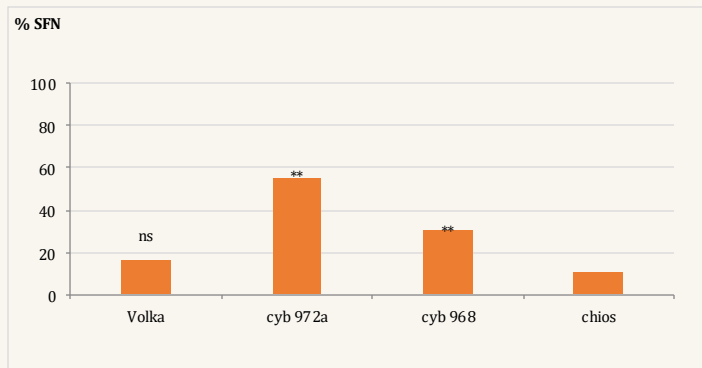
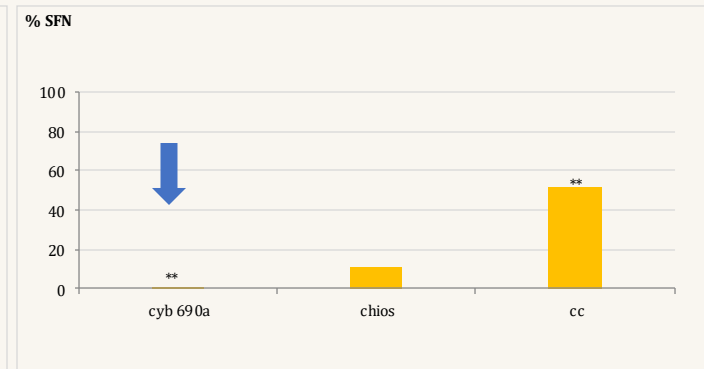
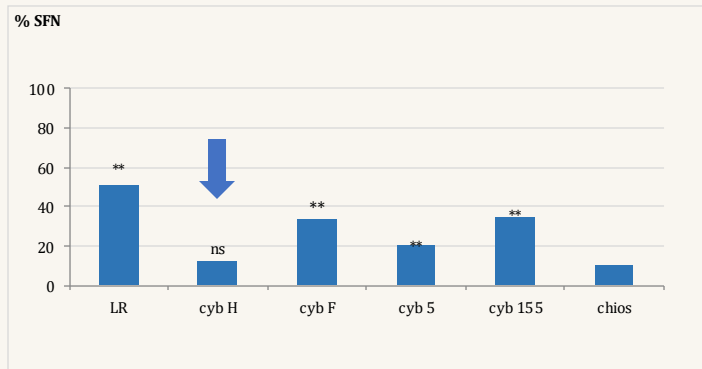
- Les feuilles 18 cybrides ont été désinfectées
- Un inoculum avec le mycélium de l'isolat de *P. citrophthora* a été placé dans la partie centrale des feuilles blessées à l'aide d'une aiguille stérile.
- Incubation des feuilles pendant 3 j à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ à la lumière



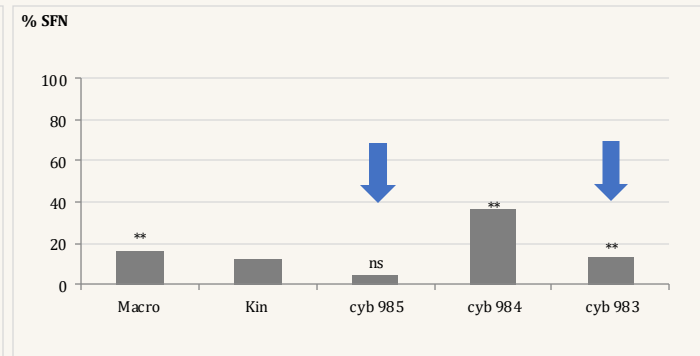
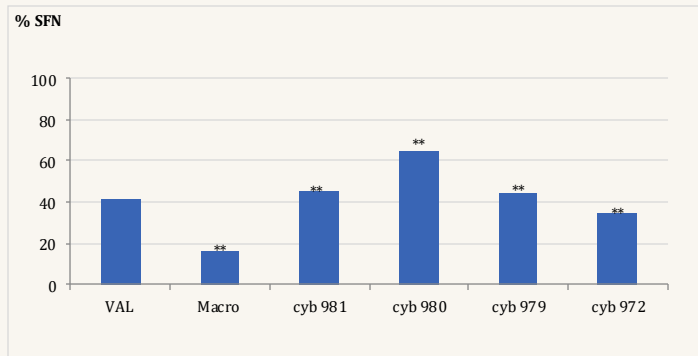
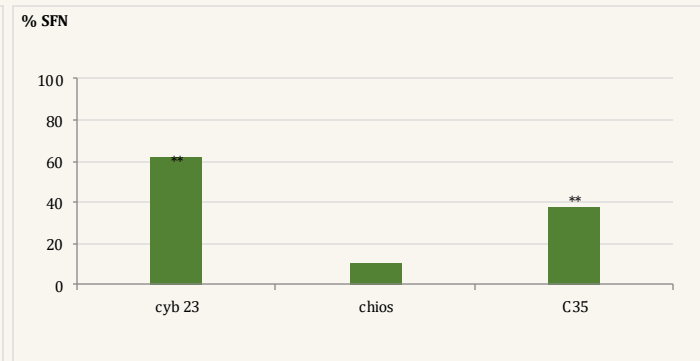
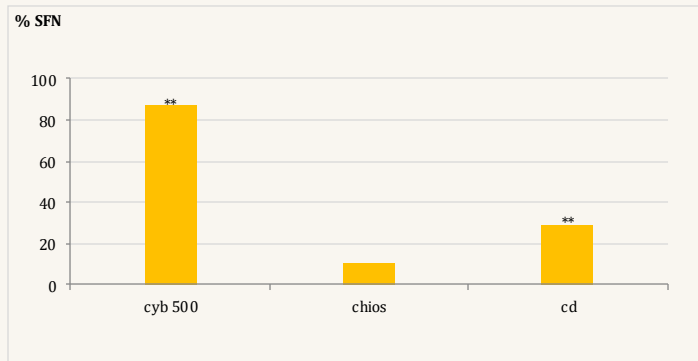


Symptômes de nécrose sur les feuilles détachées des cybrides et de leurs parents

Pourcentage de la surface et du poids des lésions des feuilles inoculées des cybrides et leur parent.



Pourcentage de la surface et du poids des lésions des feuilles inoculées des cybrides et leur parent.



Conclusion

- L'utilisation de la technique de fusion de protoplastes et des marqueurs moléculaires nous a permis d'obtenir 18 cybrides diploïdes de porte-greffes.
- L'inoculation des feuilles détachées apparaît comme un test rapide, reproductible et non destructif pour la plante, permettant de mettre en évidence des différences de sensibilité parmi les différents cybrides évalués.
- les cybrides **960a** (Md. Chios + citrange Carrizo), **cyb 985** et **983** (Md. Kinnow + C. macrophylla) , **cyb H** (Md. Chios + lime Rangpur) , **cyb 970** (Md. Chios + Citrumelo 4475) ont suscité un grand intérêt en tant que porte-greffe



Merci