

**Compte rendu d'activité  
– Thématiques Agrumes-Kiwis –  
Année 2019**

Numéro de dossier : 01 M 13397 W

**Action 2 – Etude de la variabilité génétique des porte-greffes utilisés dans  
l'agrumiculture Corse**

**I. Introduction**

La multiplication des porte-greffes d'Agrumes utilisés par les pépiniéristes est faite par semis. Or, il est connu qu'au sein d'un pool de graines, la variabilité génétique peut être importante ainsi la conformité génétique n'est pas totale. Les seuls plants conformes sont les plants issus d'embryons nucellaires. Pour certains porte-greffes et en particulier le C35 le pourcentage d'embryons zygotiques (hybrides issus de la fécondation par de l'auto pollen ou un pollen d'une autre variété) est très important (Jacquemond et al. 2013). Les variations génétiques des porte-greffes peuvent avoir des conséquences importantes sur le comportement des variétés greffées en particulier au niveau de la qualité des fruits, du rendement, mais également de leur comportement face aux maladies (Jacquemond et al. 2013). Connaître les probabilités de non-conformité pour les porte-greffes utilisés par les pépiniéristes et agrumiculteurs corses est donc un enjeu important pour la filière.

A l'heure actuelle il est possible d'étudier la conformité génétique des porte-greffes avec des outils de caractérisation moléculaire. Dans un premier temps il a été envisager de tester la conformité de 4 porte-greffes mais la définition génétique des marqueurs SNP (mutation ponctuelle d'une base de l'ADN) adaptés à l'étude puis la mise en œuvre de la caractérisation moléculaire a mis plus de temps que prévu. Face à ce problème il a été décidé de recentrer l'étude uniquement sur le porte-greffe 'Citrange C35', porte-greffe actuellement le plus utilisé en Corse et présentant des taux de non-conformité importants.

Avant le greffage les pépiniéristes réalisent un tri morphologique de chaque plant de porte-greffe et éliminent les plants qui leur semblent non conforme. L'étude réalisée sur la conformité du C35 nous permet d'évaluer l'importance du tri morphologique.

**II. Matériel et méthode**

Des prélèvements ont été réalisés en parcelle ou en pépinière et deux types d'analyses ont été réalisées sur chaque échantillons. Le niveau de ploïdie des arbres échantillonnés a d'abord été vérifié avant que les extractions et amplifications d'ADN ne soit faite pour permettre la sélection des marqueurs et es analyses de conformité. Ensuite, Toutes les manipulations de biologie moléculaire ont été réalisées à la station de recherches agronomiques de San Giuliano, UMR 1103 INRA – CIRAD.

**1. Echantillonnage**

Des écorces de 'Citrange C35' ont été prélevées sur deux sites différents, 59 échantillons dans une parcelle où un tri morphologique avait été réalisé, et 34 échantillons dans une parcelle sans tri morphologique préalable. Des feuilles de 60 porte-greffes provenant d'une pépinière et ayant fait l'objet d'un tri morphologique ont également été étudiées.

**2. Vérification du niveau de ploïdie**

Pour chaque échantillon le niveau de ploïdie est vérifié afin d'écartier les plants tétraploïdes spontanés. Les noyaux des cellules sont libérés dans un tampon puis leur ADN est coloré au DAPI\* et passé dans le cytomètre en flux. La mesure de la quantité de fluorescence émise par les noyaux permet de bâtir un profil qui en comparaison avec un profil témoin triploïde dans notre cas permet de conclure sur la quantité d'ADN de l'échantillon testé et donc son niveau de ploïdie.

\* : Le DAPI est un monochrome qui absorbe la lumière et émet une fluorescence qui permet de détecter et quantifier l'ADN par cytométrie de flux.

### **3. Extraction d'ADN, PCR et analyses de conformité**

L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du protocole du Kit Quiagen (annexe 1). La mesure de la quantité d'ADN et la vérification de sa qualité ont été réalisées grâce au nanodrop. Les PCR sont réalisées en plaque 96 puits selon le protocole Mix KASPar (annexe 2) puis le thermocycleur, programmé avec le protocole PCR KASPar (annexe 3) permet la réalisation de la PCR et la lecture de la plaque KASPar.

Les 153 échantillons sont tous étudiés avec les 8 marqueurs sélectionnés. Pour chaque plaque PCR il y a une colonne de la plaque soit 8 puits réservés aux témoins : 2 puits d'eau, 2 puits d'ADN de '*Citrange C35*' conforme et 2 puits d'ADN de Flying dragon conforme (extraction d'ADN à partir des pieds mères C35 et Flying dragon sur lesquels sont récoltés les fruits afin d'en extraire les graines des futurs porte-greffes) et 2 puits d'ADN d'oranger.

### **4. Sélection des marqueurs**

Les marqueurs testés et utilisés pour le '*Citrange C35*' ont été préalablement développés par les ingénieurs CIRAD et INRA (Bruyère et al., 2016). Dix-huit marqueurs moléculaires spécifiques du *Poncirus* sont à notre disposition afin de vérifier la conformité de chacun des échantillons. Ces marqueurs permettent de différencier totalement les *Poncirus* des *Citrus*. Le '*Citrange C35*' étant un hybride d'orange et de *Poncirus* il est donc hétérozygote pour les marqueurs choisis. Les témoins utilisés sont de l'ADN d'un pied mère de Flying Dragon (homozygote pour l'allèle *Poncirus*), de l'ADN d'oranger (homozygote pour l'allèle *Citrus*) et de l'ADN d'un pied mère de '*Citrange C35*' conforme (hétérozygote).

Nous avons dans un premier temps analysé ces 18 marqueurs afin de retenir les plus spécifiques (Figures 1a et 1b). Quatorze marqueurs sont retenus et testés sur 24 échantillons (Figure 2) afin de ne retenir que les 8 marqueurs les plus 'jolies'. (Les séquences sont présentées en annexe 4). Chaque marqueur retenu se positionne sur des chromosomes différents. Pour notre étude 8 marqueurs sont suffisants pour conclure sur la conformité ou non des échantillons puisque la probabilité qu'un plan soit zygotique (c'est-à-dire non conforme) mais présente un profil conforme (hétérozygote) pour les huit marqueurs est de  $0.5^8 = 0.4\%$

Sur toutes les figures le ou les points noirs représentent l'eau qui doit être proche de l'origine (0,0) comme coordonnées. Sur les figures 1a et 1b le point rouge représente le Flying Dragon (*Poncirus* homozygote, coordonnées proches de (0 ; Y)), le point bleu représente l'oranger (*Citrus* homozygote, coordonnées proches de (X ; 0)) et le point vert représente le '*Citrange C35*' conforme (hétérozygote) qui doit se trouver sur ou au plus près de la diagonale avec pour coordonnées (X ; Y). Dans le cas de la figure 1a le marqueur testé est rejeté car le témoin '*Citrange C35*' conforme est trop éloigné de la diagonale. En revanche le marqueur de la figure 1b est sélectionné car le témoin '*Citrange C35*' conforme est très proche de la diagonale.

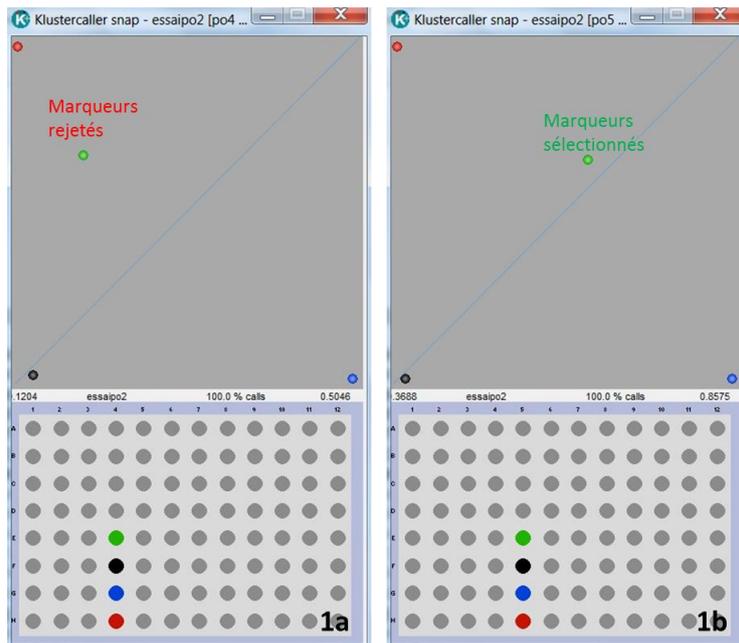


Figure 1 : Illustration de la méthode utilisées pour le premier tri des 18 marqueurs avec les trois témoins. (a) Marqueur rejeté, (b) Marqueur sélectionné.

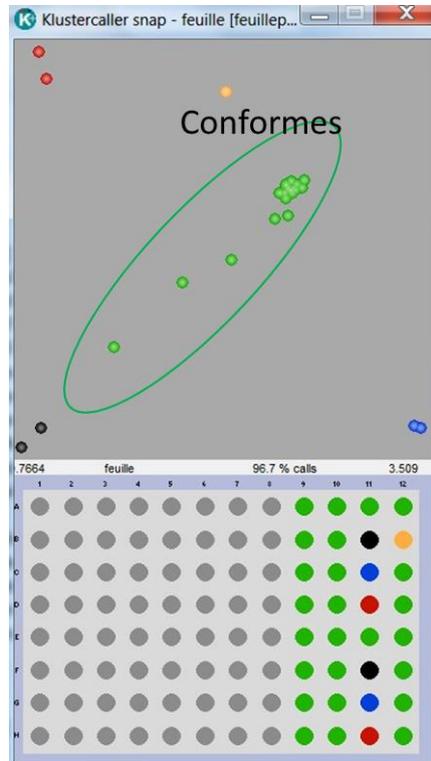


Figure 2 : exemple illustrant le second tri des marqueurs avec 24 échantillons

Les 153 échantillons sont tous étudiés avec les 8 marqueurs sélectionnés. Pour chaque PCR il y a une colonne de la plaque soit 8 puits réservés aux témoins : 2 puits d'eau, 2 puits d'ADN de C35 conforme,

2 puits d'ADN de Flying dragon conforme (extraction d'ADN à partir de pieds mères C35 et Flying dragon sur lesquels sont récoltés les fruits afin d'en extraire les graines des futurs porte-greffes) et 2 puits d'ADN d'oranger.

### III. Résultats

#### 1) Vérification du niveau de ploïdie

Tous les échantillons passés en cytométrie en flux afin de vérifier leur niveau de ploïdie sont diploïdes. (Figure 3).

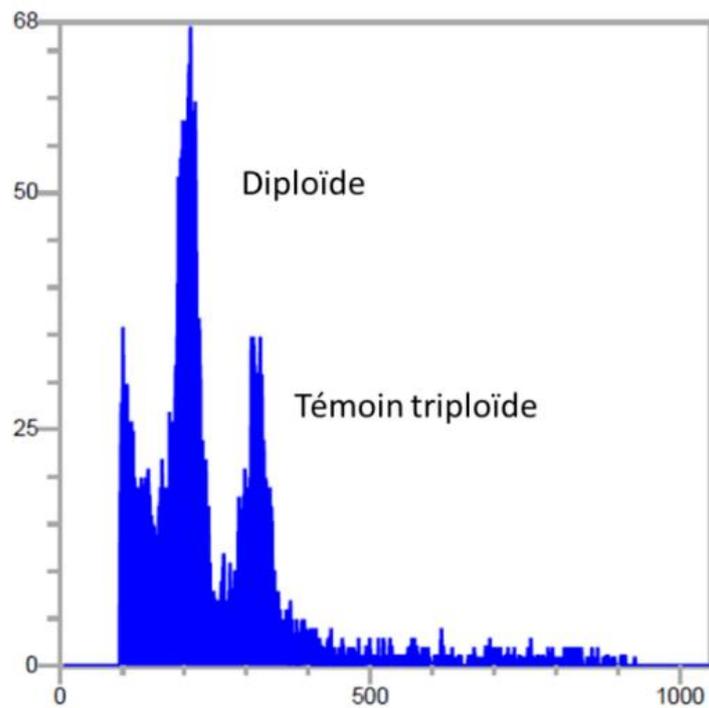
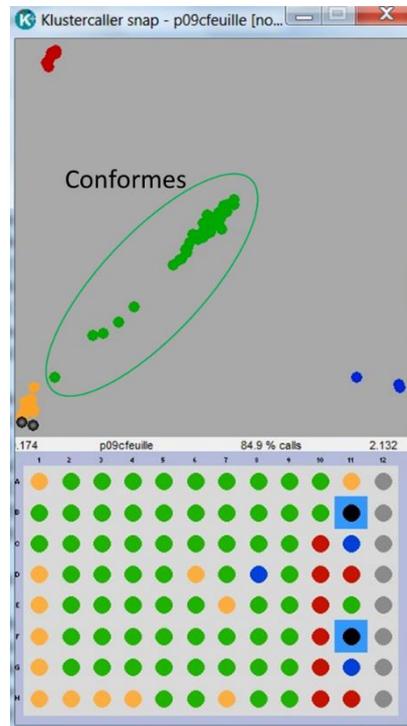


Figure 3 : Exemple d'identification du niveau de ploïdie par cytométrie en flux

## 2) Analyses de conformité

Après extraction d'ADN des 153 échantillons nous avons vérifié la conformité de ces échantillons à l'aide de 8 marqueurs SNP KASPar (Figure 4).



**Figure 4 : Illustration de résultat obtenu avec le marqueur po9\_7654621C. La colonne 11 est composé des différents témoins les colonnes 1 à 10 sont les échantillons étudié. Les points jaunes représentent les échantillons qui n'ont pas fonctionné. Sur les 80 échantillons on observe 7 non conformes (6 homozygotes pour l'allèle Poncirus –rouge- et 1 homozygote pour l'allèle oranger-bleu)) et 68 conformes (hétérozygotes) pour ce marqueur (vert).**

## IV. Conclusion

Les résultats sont variables en fonction de l'origine du matériel végétal :

- Sur les 34 échantillons sans tri morphologique préalable 17 sont non conformes soit 50%
- Sur les 59 échantillons prélevés sur différentes parcelles 17 sont non conformes soit 29%
- Sur les 60 échantillons prélevés sur des plants ayant fait l'objet d'un tri morphologique en pépinière 12 sont non conformes soit 20%.

Les résultats obtenus montrent l'importance du tri morphologique puisque l'on passe de 50% de non conformes sans tri morphologique à 20% de non conformes après tri morphologique. Malgré une nette amélioration du taux de conformité grâce au tri morphologique le pourcentage de non conformes reste malgré tout élevé (de 20 à 30%). Il semble donc important de connaître pour chaque porte-greffe utilisé dans les plantations le pourcentage moyen de non-conformité attendu et de vérifier après le tri

morphologique et avant greffage la conformité des porte-greffes et en particulier du C35 qui a un des taux de non-conformité les plus élevés parmi les différents porte-greffes couramment utilisés en Corse. La réalisation d'un listing recensant tous les caractères permettant de réaliser un tri morphologique important au stade pépinière serait très utile. Par ailleurs, suite à l'identification des plants conformes et non conformes dans les différents vergers, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la non-conformité sur les caractères agronomiques et de qualité de la variété greffée, en particulier dans le contexte de l'IGP.

#### V. **Références bibliographiques**

- Bruyère S., Luro F., Froelicher Y., Morillon R., Ollitrault P. (2016) Poncirus phylogenetic diagnostic SNPs markers are useful to analyse zygotic rates in diploid and tetraploid Citrus x Poncirus rootstock seedlings. In : Mattos Dirceu (ed.), Fermino Carlos Eduardo (ed.), Moreira Novelli Valdenice (ed.), Alves de Azevedo Fernando (ed.), Della Coletta Filho Helvécio (ed.), Vicente Contador Zaccheo Paulo (ed.). Abstract book Sustainable citriculture: the role of applied knowledge. Londrina : IAPAR, p. 125-125 International Citrus Congress, 2016-09-18/2016-09-23, Foz do Iguaçu (Brésil).
- Jacquemond, C., Curk, F., & Heuzet, M. *Les clémentiniers et autres petits agrumes*. Editions Quae, 2013.

## Annexe I : Protocole extraction ADN

 <p><b>cirad</b> LA RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT</p> <p><b>INRA</b> SCIENCE &amp; IMPACT</p> <p><b>agap</b></p>	<h3>Extraction ADN feuilles d'agrumes Kit QIAGEN</h3>	Date : 20/07/2018  Version :
---	---	------------------------------------

A l'ouverture du Kit les tampons AW1 et AW2 sont à reconstituer.

Avant de démarrer : Allumer le bain marie et préparer toutes les séries de tubes.

- Broyer ~ 100 mg de feuilles au mortier/ pilon avec seulement de l'azote
- Transférer la poudre obtenue directement dans un eppendorff de 2 ml (à l'aide d'une spatule)
- Rajouter 400 µl **AP1** + 4 µl **RNase** et vortexer, puis incuber 10 min à 65 °C
- Rajouter 130 µl **P3**, vortexer puis incuber 5 min sur la glace
- ↻ 5 min à 14000 rpm (20000g)
- Récupérer le surnageant et le mettre dans une colonne QIAshredder Minispin (violette)
- ↻ 2 min à 14000 rpm (20000g)
- Récupérer ce qui est passé à travers la colonne (~ 400µl) sans prendre le culot s'il y en a un et mettre dans un nouveau tube de 2 ml
- Rajouter 1.5 volume **AW1** (~600 µl) et mélanger en faisant des allers-retours à la pipette
- Transférer 600 µl de ce mix dans les colonnes DNeasy Minispin (blanches)
- ↻ 1 min à 8000 rpm (6000g)
- (X2) Répéter l'étape avec ce qu'il reste d'échantillon
- Mettre la colonne sur de nouveaux tubes
- Rajouter 500 µl **AW2**
- ↻ 1 min à 8000 rpm (6000g)
- Jeter ce qui est passé à travers la colonne et recommencer l'étape
- + 500 µl **AW2**
- ↻ 2 min à 14000 rpm (20000g)
- Transférer les colonnes sur des eppendorff de 1.5 ml (couper les capuchons)
- Rajouter 100 µl **Tp AE** et incuber 5 min à température ambiante
- ↻ 1 min à 8000 rpm (6000g)

## Annexe II : Protocole Mix KASPar /échantillon

ADN 2 µL à 2,5ng/µL

Tampon 5 µL

Amorce 0,14 µL

Eau 3 µL

## Annexe III : Protocole thermocycleur PCR KASpar

Etape 1 : 94° pendant 15 minutes

Etape 2 : 94° pendant 20 minutes

61° pendant 1 minute

Cette étape 2 est répétée 10 fois avec pour chaque cycle 61° un gradient de - 0, 6° pour arriver au dernier cycle à une température de 55°.

Etape 3 : 94° pendant 20 minutes

55° pendant 1 minute

L'étape 3 est répétée 26 fois

Etape 4 : 10°

## Annexe IV : Séquences des 8 marqueurs SNP retenus

po1_12626 4T	CAGCGAGTCATGATCTCGCTAAGCACAGGGAGACAGTCATTTGGGATCAC[T/A]GGCCTTACACCTTTATTCACCACA GCAAATGCTGCCTGCACTGCTGTCAT
po2_36022 134T	TCCTCCACATCATCATATTTTACTTTCAGTAGCTTCTGGGATGCTTGCAT[A/G]ACCTTACACCTGAACCAGCAGCCCC GAATGCCACTATCTTGACAGAGGAG
po4_24280 367T	AAATCAGATGTAAGGGTTGCCGGTTTCAGACATGAAATTGATTTAAACTC[G/A]TGTGTGAGCGAGGATGAAGCTTC ATTCACGCCAGCTGCTCCGAGCTCCAA
po5_41341 368T	GTGAGAAATATAGTTCATGCGAGTACTTCAGATAGGCATTTTTGTGTACA[A/C]GTGATTATGGGTTCCGGCTTGCTGT GTTGCTGCAAGGGATGGGACCCTTCC
po3_15172 063C	GCAGTGGCTGATCTTCAGCCGGTAGATGTGGTTGTATCTCACGTTCTTAA[G/A]CAAATATTGTCTACGGTATGCTGC AATATCTAAGCAGATATCTTCTTTTT
po6_59904 30C	CAGGTACGGCCTAGTGTGTTGTTCCGGATGATGTGATCGAGCCCCAGTCTGA[G/C]AAATACTGGGAGCCAAACCCACA AACCGGAGTGTGGACCTGCCAGTGG
po8_54197 5T	CCTCAAAGCCACCAGCTGCCTTTTGAAAGCCAACAGATGGGAAGTAAAA[A/G]TAGCTTCCGATTTGATCTTTCCT TGTAATGTAAGTAAATTTTTTCC
po9_76546 21C	GCTTTTTTAGGCTGATGTAATTAATAAATTGCTTACTCAGGCTGCTC[C/T]AGTCGGTTTAGTGGTTGGGTCTATT GTTTGGACTGAGGATCCGGAGGAGG