



## Compte-rendu d'activité 2020

### Projet Protect'Agrumes

#### Action subventionnée par :



Numéro de dossier : 01M 14494 W

#### I. Introduction

Le projet Protect'Agrumes est un projet de développement de méthodes de biocontrôle ciblant plusieurs bioagresseurs des principales cultures corses. La principale culture cible est bien entendu les Agrumes, deuxième secteur de production végétale sur l'île. Le projet s'articule autour de 2 axes : I- Les méthodes de lutte, II- Les substances utiles aux végétaux. L'AREFLEC est impliqué dans chacun de ces 2 axes à différentes étapes du projet. En 2020, deux objectifs principaux avaient été ciblés. Premièrement, l'évolution vers la phase d'élevage de masse des pilotes d'élevage mis au point en 2019. Deuxièmement, la capture de mineuses des Agrumes pour l'extraction des composés phéromonaux et l'évaluation des attractifs créés à partir de ces derniers par le laboratoire de chimie des produits naturels de l'université de Corte. Troisièmement, l'évaluation de produits biostimulants et biocides en vergers.

#### II. Détails des actions menées

##### **1) Elevages des auxiliaires de lutte biologique**

Quatre élevages d'auxiliaires étaient envisagés :

- A - Deux espèces d'auxiliaires contre les cochenilles farineuses.
- B - Une espèce d'auxiliaire contre la cochenille asiatique
- C - Un auxiliaire contre la mouche de l'olive.

##### **A- Auxiliaires de cochenilles farineuses**

Les auxiliaires envisagés au lancement du projet étaient la coccinelle prédatrice *Cryptolaemus montrouzieri* et le parasitoïde *Anagrus aff. Pseudococci*. Mais face à la rentabilité plus qu'incertaine d'un élevage de *C.montrouzieri* face aux principales bioindustries européennes, le choix s'est porté sur un second parasitoïde *Leptomastix dactylopii*.

Néanmoins, les prélèvements effectués *in natura* sur une parcelle de Moriani en 2020 n'ont permis de collecter que le parasitoïde *A. aff. pseudococci* (Tableau 1) et la coccinelle *C.montrouzieri*.

Ainsi, leur élevage a été initié dans les laboratoires de l'AREFLEC. Nous avons pu maintenir un élevage de cochenilles équivalent à 5 boîtes/semaine. Nous avons été limités par l'espace mais cet élevage pourrait très facilement être développé en masse dans une infrastructure adéquate. Les parasitoïdes ont été élevés avec un rendement de 300%. En moyenne 20 femelles étaient relâchées dans une boîte de cochenilles et 60 femelles étaient récupérées. Ce rendement pourra facilement être optimisé à l'avenir en adaptant les pratiques d'élevage pour maximiser la ponte et la survie des adultes.

Tableau 1 : Détail sur la campagne de prélèvement d'ennemis naturels de *P. citri* en 2020.

Lieu	Foyer	Date Pose des Pièges	Date Récupération des Pièges	Taxons parasitoïdes piégés
Moriani	1: Lime	18/06/2020	23/06/2020	Braconidae
	2: Clémentine	18/06/2020	23/06/2020	Aphelinidae ( <i>Metaphycus sp</i> )
	1: Lime	23/06/2020	26/06/2020	Ichneumonidae
	2: Clémentine	23/06/2020	26/06/2020	Metaphycus sp
	1: Lime	26/06/2020	01/07/2020	NA
	2: Clémentine	26/06/2020	01/07/2020	Eulophidae Aphelinidae
	1: Lime	01/07/2020	03/07/2020	Scelionidae Metaphycus
	2: Clémentine	01/07/2020	03/07/2020	Braconidae Aphelinidae Homalotylus Coccophagus
	1: Lime	03/07/2020	06/07/2020	Encyrtidae ( <i>Anagyrus sp.</i> ) Aphelinidae
	2: Clémentine	03/07/2020	06/07/2020	Encyrtidae
	1: Lime	06/07/2020	09/07/2020	NA
	2: Clémentine	06/07/2020	09/07/2020	NA
	1: Lime	09/07/2020	15/07/2020	NA
	2: Clémentine	09/07/2020	15/07/2020	NA
	1: Lime	15/07/2020	17/07/2020	NA
	2: Clémentine	15/07/2020	17/07/2020	NA
	1: Lime	17/07/2020	21/07/2020	
	2: Clémentine	17/07/2020	21/07/2020	
	1: Lime	21/07/2020	23/07/2020	
	2: Clémentine	21/07/2020	23/07/2020	
1: Lime	23/07/2020	27/07/2020		
2: Clémentine	23/07/2020	27/07/2020		
3: Vigne	23/07/2020		<i>Anagyrus aff. pseudococci</i>	
1: Lime	27/07/2020	30/07/2020		
2: Clémentine	27/07/2020	30/07/2020		

*A. aff. pseudococci* est un parasitoïde spécifique de *P. ficus* et *P. citri* les deux cochenilles principalement trouvée sur vignes et Agrumes. Cet élevage paraît donc essentiel puisqu'il pourrait contribuer à protéger les 2 principales filières de production végétale corses.

La rentabilité d'un élevage de *C. montrouzieri* devra être évaluée compte-tenu de la concurrence forte dans le domaine. Néanmoins, imaginer un produit incluant à la fois la coccinelle et le parasitoïde pourrait constituer une valeur ajoutée quand on sait que la combinaison de deux auxiliaires différents est plus efficace que lorsqu'ils sont utilisés séparément.

#### B- Auxiliaire contre la cochenille asiatique

Le parasitoïde *Coccobius fulvus* était envisagé pour être lâché contre la cochenille asiatique. Spécifique, il permet un contrôle de sa cible sans risquer d'effets non-intentionnels. Déjà relâché en Corse en 2008 par la FREDON, l'objectif était de le recapter pour le multiplier et ainsi relâcher des populations dans plusieurs foyers d'infestation de la plaine orientale. Malheureusement, aucun individu n'a pu être capturé en 2019 ainsi un nouvel échantillonnage devait être réalisé en 2020.

Face à l'absence manifeste de ce parasitoïde dans l'environnement, cette action ne pourra être menée à bien dans le cadre du projet Protect'Agrumes. Des discussions sont en cours avec l'INRAE pour envisager l'importation d'individus depuis le continent.

#### C- Auxiliaire *Psytalia concolor* contre la mouche de l'olive

##### 1. Amélioration de l'élevage de *Ceratitis capitata* et changement d'échelle

###### 1.1. Protocole d'élevage général :

Les adultes *C. capitata* sont placés dans une cage d'élevage cylindrique contenant de l'eau et de la nourriture (poudre de jaune d'œuf et mélange de levure et de sucre). Les individus sont stockés dans une pièce climatique à une température 22°C et une humidité de 50%. Les femelles pondent des œufs à travers une maille très fine de la cage. Les œufs se retrouvent ensuite dans un bac d'eau situé sous la maille. Ils sont récupérés à l'aide d'un tamis et transférés sur un milieu de culture artificiel (à base de poudre



Figure 1 : *Ceratitis capitata*



Figure 2: Cage d'élevage avec abreuvoir, nourriture et pupes non-émouées ; Milieu de culture avec dépôt d'œufs de couleur blanche ; Grande boîte avec du sable pour la pupation des larves

de carotte, de levure et de flocon de pomme de terre). Les œufs se transforment en larves puis en pupes. Entre ces deux derniers stades de développement, le milieu est transféré dans une contenant avec du sable pour la pupaison. Lorsque les pupes sont formées, elles sont récoltées et placées dans une cage d'élevage pour commencer un nouveau cycle de production lors de l'émergence des mouches.

## 1.2. Evolution de l'élevage de *Ceratitis capitata* de 2019 à 2020 :

En automne 2019, nous avons démarré l'élevage de *C. capitata* suite à une collecte importante de plus de 500 fruits piqués par ce ravageur (principalement figues et clémentines pour cette saison). Les mouches émergentes de ces fruits ont été placées dans une cage pour débiter l'élevage de *C. capitata*.

Une des difficultés principales d'un élevage initié à partir des mouches prélevées dans la nature est l'adaptation de ces individus sauvages aux conditions d'élevage artificielles.

Pendant la période 2019-2020, les mouches *C. capitata* se sont adaptées aux techniques d'élevage et la production a évolué en suivant trois phases de développement :

### PHASE 1 : Initiation de l'élevage (Fin 2019 – Mars 2020)

Caractéristiques d'élevage :

- 1 cage en production avec ajout des mouches émergentes en continu (en moyenne 300 individus / cage)
- Quantité d'œuf faible entre 100 et 300 œufs récoltés / jour

Ajustements / Améliorations :

- Suspension de fruits et d'une source lumineuse devant la cage d'élevage pour attirer les femelles à pondre à travers la maille (figure 3)
- Utilisation de petits contenants ronds (60mL) au regard du faible nombre d'œuf (figure 4)
- Récolte intégrale des œufs pour maximiser la production dans un premier temps (utilisation d'un pinceau fin pour décoller les œufs restants sur la maille)
- Modification de la recette du milieu de culture pour pallier les problèmes de mauvaise consistance du milieu et de développement bactérien (figure 5)



Figure 3 : Cage d'élevage avec stimulations de ponte



Figure 4 : Petit contenant

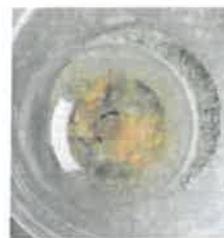


Figure 5 : Mauvais milieu

Amélioration des connaissances sur l'élevage :

- Comptage précis des œufs, des pupes et des adultes pour estimer le rendement et suivre l'évolution de la production au cours du temps :

Proportion œuf-pupe	Proportion pupe-adulte	Temps de développement
---------------------	------------------------	------------------------

30%	74%	26 jours
-----	-----	----------

(moyenne sur la période de la phase 1)

**PHASE 2 : Amélioration puis augmentation de la production (Avril – Septembre 2020)**

Caractéristiques d'élevage :

- 2 à 3 cages en production contenant entre 500 et 1500 individus
- Augmentation de la quantité d'œuf récoltée chaque jour = de 1000 à 2500 œufs récoltés / jour

Ajustements / Améliorations :

- Arrêt de la suspension des fruits et de la source de lumière pour s'affranchir de stimulations contraignantes
- Changement de contenants pour les œufs = utilisation de boîtes rectangulaires plus grandes (300mL) (figure 6)
- Arrêt de l'utilisation du pinceau pour récupérer les derniers œufs restants sur la maille car ces œufs ont un mauvais développement (potentiel dessèchement de l'œuf et fragilisation par l'action du pinceau)
- Tentative pour sérier l'élevage et augmenter la production en créant des cages d'élevage contenant des mouches qui ont émergé sur une période de 7 à 10 jours



Figure 6 : Grand contenant

Amélioration des connaissances sur l'élevage :

- Comptage précis des œufs, des pupes et des adultes pour estimer le rendement et suivre l'évolution de la production au cours du temps :

Proportion œuf-pupe	Proportion pupe-adulte	Temps de développement
20%	57%	23 jours

(moyenne sur la période de la phase 1)

- Comptage de l'évolution des morts et de la sex-ratio des cages → au bout d'une quinzaine de jours, la moitié des individus dans la cage meurt ; la sex-ratio est équilibrée mais les mâles meurent avant les femelles
- Expérience pour trouver la densité idéale d'œuf à déposer sur un milieu de culture → entre 1000 et 1500 œufs / milieu

**PHASE 3 : Vers une standardisation et une production de masse (Octobre – Décembre 2020)**

Caractéristiques d'élevage :

- 6 à 11 cages en production contenant entre 1500 et 2000 individus
- Augmentation continue de la quantité d'œuf récoltée chaque jour = entre 6000 et 23 000 œufs récoltés / jour

#### Ajustements / Améliorations :

- Arrêt du comptage précis des œufs pour aller vers un élevage de masse en standardisant le dépôt des œufs sur le milieu à l'aide d'un volume de pipette : densité approximative de 3000 œufs / milieu (meilleur rapport cout-bénéfice) (figure 7)
- Arrêt de la récupération des adultes vivants pour constituer les cages d'élevage pour aller vers un élevage de masse : création de cage avec 2000 à 3000 pupes (amélioration de l'émergence car accès direct à la nourriture et réduction des manipulations)
- Sérier l'élevage avec des cages contenant les pupes du même jour



Figure 7 : Volume d'œuf récolté à l'aide d'une pipette

#### Amélioration des connaissances sur l'élevage :

- Comptage approximatif des œufs, des pupes et des adultes pour estimer le rendement et suivre l'évolution de la production au cours du temps :

Proportion œuf-pupe	Proportion pupe-adulte	Temps de développement
27%	66%	NA

(moyenne sur la période de la phase 1)

- Test de conservation des pupes au réfrigérateur et à 12°C pour décaler la période d'émergence et évaluer la mortalité (étape préliminaire pour synchroniser les lâchers de parasitoïdes) → résultats en cours

### 1.3. Bilan et perspectives :

Suites aux ajustements des techniques d'élevage tout au long de l'année, nous avons pu domestiquer *C. capitata* et augmenter la production pour se diriger vers une production de masse. La production actuelle d'œufs atteint des niveaux élevés, cependant, seulement une faible proportion de ces œufs arrive à se développer complètement jusqu'au stade adulte. Finalement, les techniques d'élevage continuent d'être améliorées dans le but d'obtenir des meilleures proportions œuf-pupe et pupe-adulte (densité d'œuf, manipulation...). Nous poursuivons également la standardisation des opérations quotidiennes dans les élevages pour gagner du temps et faciliter la transmission et la diffusion de connaissance. D'autre part, nous continuons de maintenir une production élevée du ravageur pour augmenter l'élevage du parasitoïde *Psytalia concolor* dont les larves de *C. capitata* sont les hôtes.

## 2. Maintien puis augmentation de l'élevage de *Psytalia concolor*

### 2.1. Protocole d'élevage général :

Les adultes sont placés dans une cage d'élevage cylindrique contenant de l'eau et du miel. Les individus sont stockés dans une pièce climatique à une température 22°C et une humidité de 50%. Régulièrement, un pondoir, contenant des larves de *C. capitata* et imitant un faux fruit, est placé dans la cage. Les femelles *P. concolor* génèrent leurs descendants directement dans les larves de *C. capitata* du pondoir. Ces larves parasitées sont ensuite déposées sur un contenant avec du milieu de culture, lui-même déposé dans un grand contenant avec du sable. Les larves parasitées se transforment en pupes dans le sable. Après quelques jours, les nouveaux adultes *P. concolor* émergent et un nouveau cycle de production peut commencer.



Figure 8 : *Psyttalia concolor*

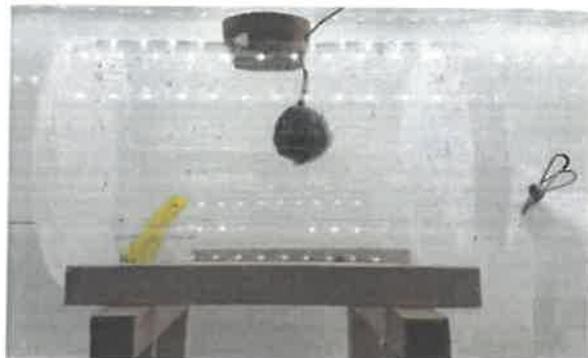


Figure 9 : Cage d'élevage de *Psyttalia concolor* un abreuvoir jaune et un pondoir suspendu par le haut

Avant de commencer un élevage du parasitoïde, il est primordial d'avoir en amont un élevage de l'hôte en forte production. La production de l'hôte doit combler les besoins pour le maintien de son élevage et le maintien de l'élevage du parasitoïde.

## 2.2. Evolution de l'élevage de *Psyttalia concolor* de 2019 à 2020 :

*P. concolor* est un parasitoïde naturellement présent en Corse qui parasite les larves de la mouche de l'olive *Bactrocera oleae*. Suite à des prélèvements d'olives piquées en automne 2019, nous avons pu démarrer l'élevage du parasitoïde à petite échelle avec une partie des *P. concolor* sauvages récupérés des olives (pour rappel, l'autre partie des individus a été conservée dans de l'alcool pour confirmer l'espèce par une identification moléculaire). Pendant la période 2019-2020, l'élevage de *P. concolor* a connu deux phases de développement qui sont les suivantes :

### **PHASE 1 : Maintien de souche (Fin 2019 – Septembre 2020)**

En début d'année 2020, l'élevage de l'hôte *C. capitata* n'était pas au point et la production de larves, indispensables pour l'élevage de *P. concolor*, n'était pas suffisante pour combler les besoins des deux élevages. Ainsi, l'élevage de *P. concolor* était pendant une grande partie de l'année en phase de maintien de souche avant d'atteindre des productions massives de larves de *C. capitata*.

Caractéristiques d'élevage :

- 1 cage avec une cinquantaine d'individus

- 1 pondoir / semaine avec en moyenne 15 larves de *C. capitata* âgées de 7 jours mis en place pendant 7h pour maintenir les élevages et s'entraîner à la confection de pondoirs

#### Ajustements / Améliorations :

- Abaissement de la température d'élevage à 19°C pour allonger la durée de vie des individus
- Prélèvement individuel des larves de *C. capitata* à la pince souple pour connaître exactement le nombre d'hôtes

#### Amélioration des connaissances sur l'élevage :

- Comptage précis des larves de *C. capitata* mises à disposition pour le pondoir, des pupes formées et des émergences de *P. concolor* afin de connaître le taux de parasitisme → en moyenne 71% de taux de parasitisme sur 80% de pupes formées
- Suivi des émergences → période de 10 jours d'émergence pour un pondoir
- Evaluation de la sex-ratio → en moyenne 60% de femelles et 40% de mâles

#### **PHASE 2 : Augmentation par de nouveaux prélèvements d'olives (Octobre 2020 – Décembre 2020)**

En automne 2020, nous avons renouvelé les prélèvements d'olives piquées, ce qui nous a permis de récolter plus de 1200 *P. concolor* sauvages. L'élevage du parasitoïde a enfin pu être redynamisé suite à cet ajout d'individus sauvages. D'autre part, cette période de récolte de *P. concolor* coïncidait avec le moment où l'élevage de l'hôte était en augmentation. De ce fait, nous avons pu amplifier le nombre de pondoirs présentés aux *P. concolor* dans le but d'augmenter la population d'élevage.

#### Caractéristiques d'élevage :

- 3 cages avec environ 400 individus dont au minimum 200 femelles / cage
- Passage de 3 à 9 pondoirs / semaine avec de 60 à 300 larves de *C. capitata* âgées de 8 jours mis en place pendant 7h

#### Ajustements / Améliorations :

- Température optimale pour le développement des parasitoïdes de 22°C
- Arrêt du prélèvement individuel des larves pour aller vers un élevage de masse en simplifiant la collecte de larves par l'utilisation d'un tamis
- Arrêt du comptage précis des larves pour tendre vers un élevage de masse en essayant de standardiser la quantité de larves utilisées pour un pondoir



Figure 10 : Première tentative de standardisation de la quantité de larves avec une cuillère à café

Amélioration des connaissances sur l'élevage :

- Attente de résultats concernant la production moyenne d'individus pour un pondoir standardisé d'environ 300 larves

### 2.3. Bilan et perspectives

Tout au long de l'année 2020, nous avons réussi à maintenir l'élevage de *P. concolor*. Contrairement à l'année dernière, les conditions actuelles sont bonnes pour continuer d'accroître la population d'élevage de *P. concolor* et tendre vers un élevage de masse pour des futurs lâchers.

Les prochaines améliorations d'élevage seront en lien avec les besoins et les conditions de lâcher en lutte biologique, le but étant de lâcher un grand nombre de femelles à un moment précis. Nous tenterons ainsi d'ajuster les techniques d'élevage pour collecter de nombreuses femelles *P. concolor* et pour regrouper leurs émergences (conservation des pupes à des températures basses, réduction du temps d'exposition du pondoir, modification de la sex-ratio en faveur des femelles...).

## 2) Médiateurs chimiques

Cette thématique a été hautement impactée par la pandémie de COVID-19. Un stage de 6 mois pleinement dédié à ce travail a dû être annulé face à l'impossibilité d'accueillir un.e stagiaire dans des conditions permettant sa sécurité sanitaire.

Néanmoins, la mobilisation de personnel initialement dédié aux élevages d'auxiliaires a permis la capture de mineuse des agrumes et l'extraction de leur composés phéromonaux en hexane. Es captures ont eu lieu sur une parcelle de jeunes clémentiniers cultivés en bio sur la commune de Linguizzetta. Un nombre plus important que l'année passée a pu être capturé. Par ailleurs, la méthode d'extraction des pupes de leur cocon pour le sexage avait provoqué une grande mortalité en 2019 menant à de faibles taux d'émergence. Le procédé a été mieux maîtrisé en 2020 atteignant des taux d'émergence de 60% en fin de saison quand ils étaient bien inférieurs à 50% en 2019 (Tableau 2).

**Tableau 2 : Détails de la campagne de prélèvement de pupes de mineuse des Agrumes en 2020.**

Date prélèvement	Nombre de pupes			Emergences			taux
	mâles	femelles	total	mâles	femelles	total	
11/08/2020	128	208	236	59	36	95	40.3
13/08/2020	13	11	24	6	4	10	41.7
18/08/2020	23	24	47	7	2	9	19.1
20/08/2020	100	107	207	43	49	92	44.4
25/08/2020	82	78	160	71	32	103	64.4
27/08/2020	70	59	129	45	43	88	68.2
01/09/2020	39	40	79	23	26	49	62.0
03/09/2020	30	39	69	24	16	40	58.0
08/09/2020	55	40	95	34	23	57	60.0
		<b>total</b>	<b>1046</b>	312	231	<b>543</b>	<b>50.9</b>

Les solutions d'hexane résultant des extractions ont été confiées au laboratoire de chimie des produits naturels de l'Université de Corte mais, également fortement affecté par la pandémie, les analyses n'ont pour l'instant pas pu être réalisées.

## **AXE 2 : BIOSTIMULANTS ET BIOCIDES INNOVANTS**

Cette thématique a été fortement impactée par la pandémie de COVID-19 et par l'absence pour congé maternité et maladie de la salariée en charge de cette thématique chez le partenaire InterBio Corse. Au point mort en 2020, cette thématique sera réévaluée par les partenaires début 2021 pour en redéfinir des objectifs réalisables avant la fin du projet.

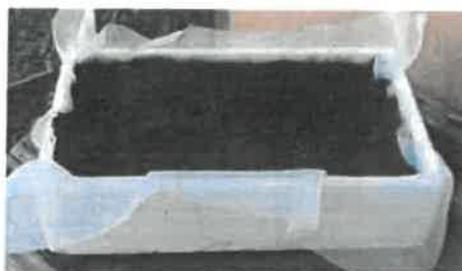


Figure 1 : bac de semis

Il existe une non-conformité théorique pour chaque porte-greffe, il est donc nécessaire de surestimer les semis afin d'obtenir le nombre de porte-greffe conformes nécessaires. Le tableau ci-dessous montre les quantités de graines semées par rapport aux quantités nécessaires à l'essai :

Tableau 1 : nombre de graines plantées par rapport aux besoins de l'essai

Porte-greffe	Total plants nécessaires	Total graines semées	% « théorique » non conformes
Poncirus rubidoux (2x)	24	190	5 à 10
Poncirus rubidoux(4x)	24	190	5 à 10
Citrumelo 4475 (2x)	24	190	5 à 10
Citrumelo 4475 (4x)	24	190	30 à 40
Citrandarin poncirus Cleopatra 2X	24	190	5 à 10
Citrandarin poncirus Cleopatra 4X	24	190	5 à 10

Une fois les plants germés, ils ont été repiqués dans des pots de 3 litres lorsqu'ils ont atteint le stade de deux feuilles. Un tri morphologique a été réalisé à ce moment pour écarter les plants dont les racines étaient malformées (Figure 2) ou présentaient des caractères foliaires différents.

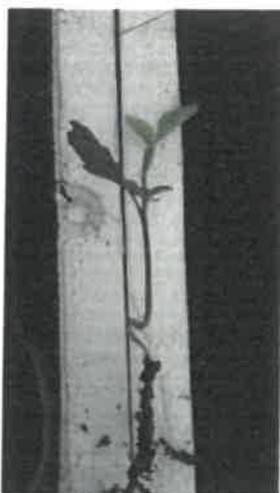


Figure 2 : malformation racinaire sur *Citrumelo 4475* tétraploïde (col de cygne)

La conformité génétique des plants a ensuite été réalisée en laboratoire afin d'effectuer un dernier tri sur les porte-greffes (Action menée par ailleurs – voir rapport « Conformité Porte-greffe 2020 »).

### III. Résultats

Les graines commandées en novembre 2019 ont été réceptionnées le 14 janvier 2020. Les semis ont été réalisés le 6 février 2020 et le 10 février 2020.

Sur l'ensemble des semis réalisés, des problèmes de germinations ont été observés sur la variété *Poncirus rubidoux* diploïde où seulement 38% des graines ont germées (Figure 3). Les plants se sont mal développés par la suite et sont donc plus petits que leur équivalent tétraploïde. Les autres variétés ont eu en moyenne un taux de germination de 90%.



Figure 3 : barquette de semis *P. rubidoux* diploïde

Le tri morphologique réalisé au moment du repiquage a permis d'éliminer des plants non conformes visuellement. On distingue deux niveaux de non-conformité morphologique.

#### a) La non-conformité foliaire

Certaines variétés sont particulièrement « stables » sur ce critère notamment les *Poncirus rubidoux* diploïde et tétraploïde pour lesquelles aucune non-conformité foliaire n'a été observée. En revanche, les autres variétés tétraploïdes présentent des plants non conformes notamment le *Citrandarin poncirus Cleopatra* tétraploïde et le *Citrumelo 4475* tétraploïde avec respectivement 5% et 10% de plants non conformes. Le *Citrandarin poncirus Cleopatra* diploïde présentent quant à lui 4% de plants non conformes.

#### b) La non-conformité racinaire

L'ensemble des porte-greffes étudiés présentent en moyenne 7% de plants avec des malformations racinaires. Les variétés tétraploïdes présentent un fort taux de malformation racinaire avec jusqu'à 30% des plants non conformes notamment pour le *Citrumelo 4475* tétraploïde.

Le tableau ci-dessous récapitule le nombre de plants conformes après le tri morphologique. Tous les plants n'ont pas ensuite été analysés génétiquement car certains sont restés trop chétifs pour être considérés comme viables (tableau 2).

**Tableau 2 : nombre de plants conformes après tri morphologique (foliaire et racinaire)**

Porte-greffe	Nombre de graines germées	Nombre de plants conformes après tri morphologique
<i>Poncirus rubidoux</i> (2x)	72	67
<i>Poncirus rubidoux</i> (4x)	175	163
<i>Citrumelo 4475</i> (2x)	185	173
<i>Citrumelo 4475</i> (4x)	150	104
<i>Citrandarin poncirus Cleopatra</i> 2X	179	160
<i>Citrandarin poncirus Cleopatra</i> 4X	181	160

c) La non-conformité génétique

Les analyses en laboratoires ont permis de sélectionner les porte-greffes génétiquement conformes à la variété désiré. Malgré un tri des porte-greffes, certaines variétés présentent un fort taux de plants non conformes génétiquement notamment le *Citrandarin poncirus Cleopatra* tétraploïde avec 61% de plants non conformes, le *Citrumelo 4475* tétraploïde avec 33% (tableau 3). Les analyses sur les *Poncirus rubidoux* n'ont pas pu être effectuées cette année, elles seront faites en 2021.

**Tableau 3 : nombre de plants conformes génétiquement par rapport au nombre de plants repiqués**

Porte-greffe	Nombre de plants analysés	Nombre de plants conformes génétiquement	% de conformité
<i>Citrumelo 4475</i> (2x)	75	60	91%
<i>Citrumelo 4475</i> (4x)	104	78	75%
<i>Citrandarin poncirus Cleopatra</i> 2X	60	52	87%
<i>Citrandarin poncirus Cleopatra</i> 4X	70	27	39%

Ci-dessous, les caractéristiques foliaires de plants génétiquement conformes à la variété. Il est impossible visuellement de faire la différence entre les plants diploïdes et leur équivalent tétraploïde.



Feuille de *Citrumelo 4475* diploïde

Feuille de *Citrumelo 4475* tétraploïde



Feuille de *Citrandarin*  
diploïde

Feuille de *Citrandarin*  
tétraploïde



Feuille de *P. rubidoux*  
diploïde

Feuille de *P. rubidoux*  
tétraploïde

#### IV. Conclusion

Les taux de germinations de chaque porte-greffes ont été plutôt bons sur la majorité des porte-greffes excepté le *Poncirus rubidoux* diploïde. Cette différence est certainement due à une mauvaise conservation des graines. Nous n'avons pas observé de différence significative de taux de germination entre les variétés diploïdes et tétraploïdes pour les autres variétés.

Au niveau du tri morphologique, les variétés tétraploïdes ne possèdent pas nécessairement plus de variabilité foliaire. En revanche, les malformations racinaires sont plus récurrentes sur ces variétés que sur leurs équivalents diploïdes. Par ailleurs, il est impossible de différencier sur le plan morphologique des plants tétraploïdes et diploïdes de même variété.

L'ensemble des analyses génétiques n'ont pas pu être réalisées sur les deux variétés de *Poncirus*. En revanche, elles ont été effectuées pour les autres porte-greffes. Pour les autres variétés, malgré des quantités de plants non conformes génétiquement, les porte-greffes sont en nombre assez importants pour pouvoir démarrer les greffages en 2021. Il apparaît que le tri visuel n'est pas suffisant pour écarter les plants non conformes de la variété et qu'il est nécessaire de procéder à des analyses génétiques pour valider la conformité.

#### V. Références bibliographiques

Allario T, Brumos J, Colmenero-Flores JM, Iglesias DJ, Pina JA, Navarro L, Talon M, Ollitrault P, Morillon R. (2013) Tetraploid Rangpur lime rootstock increases drought tolerance via enhanced constitutive root abscisic acid production. *Plant Cell Environ.* 36: 856-68.

De Oliveira TM, Ben Yahmed J, Dutra J, Maserti BE, Talon M, Navarro L, Ollitrault P, Gesteira A, Morillon R. (2016) Better tolerance to water deficit in doubled diploid 'Carrizo citrange' compared to diploid seedlings is associated with more limited water consumption and better H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging. Accepted for publication. *Acta Physiologia Plantarum*.

François Luro, Emmanuel Bloquel, Bruno Tomu, Gilles Costantino, Isabelle Tur, Simone Riolacci, François Varamo, Patrick Ollitrault, Yann Froelicher, Franck Curk and Olivier Pailly. *The INRA-CIRAD citrus germplasm collection of San Giuliano, Corsica in AGRUMED: Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean: Acclimatization, diversifications, uses*. Zech-Matterne Véronique (ed.) ; Fiorentino Girolamo (ed.). Naples: Publications du Centre Jean Bérard, 2017; p243-261. ISBN: 9782918887775. DOI: 10.4000/books.pcjb.2107

Oustric, Julie, Morillon, Raphaël, Ollitrault, Patrick, *et al.* Somatic hybridization between diploid *Poncirus* and *Citrus* improves natural chilling and light stress tolerances compared with equivalent doubled-diploid genotypes. *Trees*, 2018, vol. 32, no 3, p. 883-895.

Oustric, Julie, Morillon, Raphaël, Luro, François, *et al.* Nutrient deficiency tolerance in citrus is dependent on genotype or ploidy level. *Frontiers in plant science*, 2019, vol. 10, p. 127

Ruiz M, Alcántara B, Aleza P, Morillon R, Navarro L, Primo-Millo E, Martínez-Cuenca . (2016a). Effects of salinity on diploid (2x) and doubled diploid (4x) *Citrus macrophylla* genotypes. *Scientia Horticulturae* 207: 33-40

Ruiz M, Quiñones A, Martínez- Cuenca, M-R; Aleza P, Morillon R, Navarro L, Primo-Millo E, Martínez Alcántara B. (2016b). Tetraploidy improves salinity tolerance in Carrizo citrange seedlings (*Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Journal of Plant Physiology*. Sous presse.

Saleh B., Allario T., Dambier D., Ollitrault P. Morillon R. (2008). Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes Rendus de Biologie de l'Académie des sciences* 331: 703-710.