

<i>Titre de l'essai :</i>	Identification des principaux cultivars donneurs de pollen pour les variétés patrimoniales d'oliviers corses	
<i>Code de l'essai :</i>	EP.OLI.01.18	
<i>Partenariats :</i>	 FranceAgriMer	
<i>Auteur</i>	Julien BALAJAS	
<i>Rédition</i>		
<i>Auteur</i>		

Sommaire

Thème de l'essai
But de l'essai
Facteurs et modalités étudiés
Matériel et Méthode
Résultats détaillés
Conclusion de l'essai

VALIDATION FIRME
Date et visa :

VALIDATION RESPONSABLE ESSAI
Responsable : J. Balajas
Date :
Visa :

	Approbateur
Nom	J.Balajas
Fonction	Responsable essais
Date	19/02/2016
Visa	

Espèce(s) : *Olea europaea*

Année 2018

Identification des principaux cultivars donneurs de pollen pour les variétés patrimoniales d'oliviers corses.

Date : Janvier 2019

Rédacteur(s) : Julien BALAJAS

Essai rattaché à l'action n° :

Titre de l'action : Evaluation du potentiel agronomique et organoleptique des principales variétés d'oliviers corses.

1. Thème de l'essai

Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'Université de Lille. Il a fait l'objet d'un stage de Master 1 réalisé avec Adèle Ragot-Richard.

Depuis l'obtention d'une AOC en 2004, puis d'une AOP en 2007, la filière oléicole Corse se professionnalise et se développe. Aujourd'hui ce sont plus de 135 000 oliviers qui sont exploités, répartis sur environ 630 hectares, avec en moyenne 60% de la production annuelle d'huile labellisée. Ce chiffre est même en augmentation car il y a de nombreux projets de plantations, avec en moyenne 20 à 25 ha d'oliviers plantés par an malgré un contexte sanitaire peu favorable (lié à la détection de *Xylella fastidiosa* souche *Pauca* sur oliviers dans la région des Pouilles en Italie et souche *multiplex* sur différentes essences de Corse). Ces données traduisent parfaitement le dynamisme actuel de la filière oléicole régionale. Mais pour pérenniser cette tendance, les professionnels et les institutions se doivent de continuer à travailler afin d'améliorer les performances techniques et économiques des exploitations. Cette évolution passe nécessairement par une meilleure connaissance des caractéristiques agronomiques et organoleptiques des cultivars corses et par une augmentation de la productivité des vergers. L'optimisation de la pollinisation des arbres est l'un des facteurs qui a une influence positive sur le rendement des vergers.

L'olivier (*Olea europaea L.*) est une espèce andromonoïque (i.e. les espèces au sein desquelles les individus portent à la fois des fleurs hermaphrodites et des fleurs mâles) et allogame, c'est à dire pollinisée par le vent. Comme beaucoup de plantes hermaphrodites, sa floraison est généralement abondante mais le taux de nouaison est faible et les rendements bas et instable. Tronco et al. ont rapporté que seulement 25 % environ des ovaires de l'olivier sont retenus après la chute des pétales, avec une nouaison finale moyenne d'environ 2% (ce chiffre peut cependant varier de manière considérable d'une année sur l'autre).

Pour optimiser la production, il est donc nécessaire d'associer aux variétés productrices de fruits, des variétés donneuses de pollen, appelées par les oléiculteurs : pollinisateurs. Un bon pollinisateur est caractérisé par sa synchronisation de floraison mais également par la compatibilité de son pollen avec l'arbre receveur. Aujourd'hui, suite à la découverte de l'existence de deux groupes d'incompatibilités chez l'olivier (Saumitou-Laprade & al. 2017), il convient :

- ⇒ De vérifier la concordance des moments floraison entre les différentes variétés.
- ⇒ de définir, par la méthode des tests stigmatiques, le groupe d'incompatibilité (G1 ou G2) de chaque variété corse
- ⇒ de vérifier, par des croisements contrôlés, si la compatibilité, identifiée lors des tests stigmatiques, permet une meilleure production de fruits
- ⇒ d'analyser la composition génétique et la structuration du nuage pollinique dans une zone oléicole composée en grande majorité par des arbres multiséculaires d'une même variété
- ⇒ de définir quels sont les génotypes à l'origine de la production de fruit dans ce type de verger

Toutes ces données aboutiront peut-être à une réorganisation des vergers afin d'optimiser la fécondation des oliviers pour garantir une nouaison plus élevée et donc des rendements plus importants.

	ENREGISTREMENT	EN.PE.08 3/ 12
	RAPPORT RESULTATS D'ESSAI	Date création : 08/04/05 Version : 03

2. But de l'essai

- ⇒ Définir, par la méthode des tests stigmatiques, le groupe d'incompatibilité (G1 ou G2) de chaque variété corse.
- ⇒ Vérifier par des croisements contrôlés si la compatibilité, identifiée lors des tests stigmatiques, permet une meilleure production de fruits.
- ⇒ Analyser le nuage pollinique pour comprendre les évènements de fécondation

3. Matériel et Méthodes

Définition du groupe d'incompatibilité (G1 ou G2) de chaque variété corse par la méthode des tests stigmatiques :

Le test stigmatique, utilisé pour déterminer l'existence du système d'auto-incompatibilité diallélique sporophytique chez l'olivier (Saumitou-Laprade & al. 2017), permet de déterminer la compatibilité entre le pollen d'une variété et les stigmates d'une autre en observant le succès de germination du tube pollinique au microscope à fluorescence. Effectué sous forme d'un diallèle, il permet de tester simultanément plusieurs variétés qui sont chacune utilisées comme donneuse et receveuse de pollen. Les variétés étudiées Ghjermana di Balagna, Sabina, Zinzala, Curtinese et Aliva Nera sont cultivées en pot, dans les serres de l'AREFLEC, un environnement qui diminue les risques de contamination pollinique associés au nuage pollinique lors de la pleine floraison dans les vergers. La floraison étant plus précoce sous serre que dans les vergers, ces expérimentations ont pu être effectuées dès la deuxième semaine du mois d'avril.

1. **Récolte des stigmates et du pollen :** Des sacs d'isolement (16 x 50 x 16 cm, PBS3d/50 bags) sont placés sur les rameaux des plants de deux ans, une semaine avant la floraison pour éviter la contamination pollinique. Dès l'ouverture des premières fleurs, les rameaux sont coupés et ramenés dans le laboratoire de l'AREFLEC. Le sécateur utilisé doit être stérilisé entre chaque arbre avec de l'alcool à 70 ° pour prévenir la transmission de pathologies. Au laboratoire, les rameaux sortis des sacs sont effeuillés, fractionnés en plus petits rameaux, et les fleurs ouvertes sont éliminées. Pour chaque variété, les rameaux sont placés dans deux récipients différents avec de l'eau, dans des sacs plastiques fermés, pour créer une chambre humide (qui permet l'ouverture des fleurs et retarde la déhiscence des anthères) et empêcher les contaminations. Les sacs sont entreposés pour 16 à 24 h dans une salle, entre 20 et 25°C, en évitant l'exposition au soleil. En attendant l'ouverture des fleurs, cinq grandes boîtes de Petri contenant un milieu gélosé sont préparées et numérotées. À l'aide d'un marqueur, chaque boîte est divisée en cinq secteurs, numérotés, dans lesquels seront disposés les stigmates correspondant au numéro de chaque variété. Tous les stigmates d'une même boîte de Petri seront pollinisés par le pollen correspondant au numéro de la variété inscrit sur la boîte. Une fois que les fleurs d'une variété sont ouvertes, celles contenues dans un des deux récipients sont émasculées : avec une pince fine, la corolle et les étamines sont retirées. Ensuite, les fleurs sont détachées avec une pince fine en tirant sur le pédicelle, puis déposées une par une dans un récipient propre afin de recouper leur pédicelle à l'aide d'un scalpel. Un minimum de trois fleurs sont ensuite plantées dans le secteur correspondant au numéro de la variété dans les cinq boîtes de Petri. Les boîtes ainsi préparées sont placées dans un sac plastique propre fermé et stocké à 15-20 °C pendant au moins 24 h, le temps que les stigmates continuent de mûrir. Si les fleurs des différentes variétés ne s'ouvrent pas en même temps, les boîtes de Petri doivent être placées au réfrigérateur. Les stigmates peuvent être conservés en état de réceptivité à 4 °C pendant plusieurs jours. Pour récupérer le pollen, quand la majorité des fleurs d'une variété sont ouvertes (entre 16 et 36 heures), dans une pièce chaude, sèche et sans courant d'air, les rameaux sont retirés du sac plastique pour générer le choc hygrométrique qui va provoquer l'ouverture des anthères (déhiscence). Les rameaux sont ensuite positionnés sur une feuille de papier bleu et lisse, pliée en son centre pour faciliter la récolte du pollen. Chaque rameau doit reposer 1 à 3 heures (le temps que la déhiscence ait lieu) puis des petits coups secs sont donnés sur les rameaux maintenus au plus proche du papier pour faire tomber le pollen. Le pollen est alors stocké dans une dosette de papier aluminium (sur laquelle le numéro de l'arbre et la variété sont notés) et transféré à 4 °C (il conserve sa capacité à germer au moins 3 semaines dans ces conditions). Les stigmates et le pollen de génotypes différents sont impérativement récoltés séparément, et les ustensiles et plans de travail doivent être bien nettoyés à l'alcool à 95 °C entre chaque manipulation.
2. **Pollinisation sous la loupe binoculaire :** Une boîte de Pétri contenant les stigmates à tester et une dose du pollen correspondant au numéro sur la boîte sont ensuite sorties du réfrigérateur. La pointe d'un cure-dents est enduite du pollen préparé précédemment. Le pollen est ensuite déposé sur tous les stigmates de la boîte.

Le cure-dents doit être changé entre chaque pollen utilisé, c'est à dire entre chaque boîte de Petri contenant les stigmates des différentes variétés. Les boîtes sont ensuite placées dans des sacs plastiques pour permettre la germination des tubes polliniques à température ambiante pendant 16 à 24h. La feuille de fixation qui précise la référence du receveur et du donneur dans chaque croisement et assigne à ce dernier un numéro de tube de fixation doit immédiatement être renseignée. Après le temps laissé pour la croissance des tubes polliniques, la réaction est stoppée par la fixation dans le FAA (formaldéhyde, acide acétique, éthanol) : les fleurs d'un même génotype pollinisées par un même pollen sont placées ensemble dans le tube de fixation numéroté correspondant au croisement. Dans le fixateur les fleurs pollinisées peuvent être conservées plusieurs années avant la coloration au bleu d'aniline.

3. **Coloration et observation au microscope à fluorescence** : Les fleurs sont ensuite rincées deux fois à l'eau bi-permutée, traitées au colorant Z (annexe 3) pendant une heure à 65°C et montées entre lame et lamelle dans une goutte de bleu d'aniline (annexe 4) et observées avec un microscope à fluorescence. Cette étape a été réalisée à l'université de Lille par Pierre Saumitou-Laprade.

Vérification de la compatibilité identifiée lors des tests stigmatiques par des croisements contrôlés, et impact sur la production de fruits.

Le principe du test post-zygotique est de réaliser une pollinisation en conditions contrôlées afin de définir ou valider la compatibilité et l'incompatibilité entre deux variétés, par observation de la production de fruits, en conditions naturelles et sans contamination du nuage pollinique extérieur.

Plusieurs modalités de croisement sont effectuées, sur une parcelle à Lama en Balagne (Haute Corse) sur laquelle sont présentes des variétés multiséculaires Ghjermana Di Balagna et Sabina. Le but est de valider la compatibilité entre ces deux variétés, déterminée lors des tests stigmatiques effectués auparavant, et étudier la maturation des fruits potentiellement produits. Pour cela le protocole de croisements utilisé lors de la détermination du système de reproduction chez l'olivier est suivi (Saumitou-Laprade & al., 2017). Des témoins (croisement par du pollen incompatible) ont été réalisés en parallèle sur les mêmes arbres.

1. Modalité de croisement : Nous avons choisi quatre individus de la variété Sabina (les arbres 430, 431, 434, 435) et trois individus de la variété Ghjermana di Balagna (les arbres 442, 446, 447), tous en bon état sanitaire. Les variétés d'appartenance ont été validées par un génotypage microsatellite multi-locus produit par l'entreprise ADNid à Montpellier. Pour chaque arbre, deux modalités de pollinisation sont effectuées, sur deux rameaux distincts : une pollinisation avec du pollen issu d'un arbre de la même variété et une pollinisation avec du pollen provenant de l'autre variété (voir tableau page suivante). Les croisements sont effectués à l'intérieur de sac d'isolement, munis d'une petite fenêtre, (16 x 50 x 16 cm, PBS3d/50 bags) afin d'éviter toute contamination par le nuage pollinique présent sur la parcelle. Les sacs sont installés sur deux rameaux d'un même arbre d'environ 50 cm portant de nombreux bourgeons floraux, à hauteur de tête, une semaine avant l'ouverture des fleurs. Sur chaque rameau, le premier sac est installé et rendu étanche en plaçant un morceau de coton à l'emplacement du nœud. Il ne sera jamais ouvert lors des manipulations. Le second sac est placé sur le premier (les deux fenêtres du même côté), bien fermé avec une ficelle. Le numéro du receveur et du pollinisateur est noté sur chaque sac et sur une étiquette sur le rameau à la base du sac, signalant la section de rameau concernée par le croisement après que le sac ait été retiré (un mois après le croisement). Pour éviter tout arrachage du sac à cause du vent, une ficelle nouée à la base du sac est solidement attachée à une branche plus solide et plus haute.

Afin de faciliter les manipulations, le pollen est récolté sur les mêmes individus que ceux choisis comme receveurs. Des sacs d'isolement sont placés sur des rameaux portant de nombreux bourgeons floraux deux semaines avant la floraison estimée. Le numéro et la variété de l'arbre y sont inscrits.

Génotype receveur		Génotype donneur	
		Ghjermana di Balagna	Sabina
Ghjermana di Balagna	442	447	435
	446	442	431
	447	446	430
Sabina	430	446	431
	431	447	435
	435	442	430

Tableau 1 : Modalités de croisements des tests post-zygotiques, avec les génotypes donneurs de pollen en colonne et les génotypes receveurs en lignes.

2. Récolte et conditionnement du pollen : Lorsque les premières fleurs commencent à s'ouvrir, les rameaux sont coupés. Dans un local de la station, le même protocole de récolte de pollen que lors des tests stigmatiques est réalisé. Une fois récolté, le pollen est tamisé, mélangé avec du talc en proportion 50/50, et conditionné dans des gélules de manière à avoir plusieurs gélules de pollen par arbre. Celles-ci sont stockées, à 4°C, dans un tube Falcon.
3. Pollinisation : Une fois que les deux types de pollens sont récoltés, la pollinisation manuelle réalisée à l'aide d'injecteurs à pollen, est déclenchée (= J0). A J2, J4 et J7 le pollen est injecté dans les sacs. Le mélange pollen-talc est versé dans le réservoir du pistolet à pollen (chaque injecteur est spécifique à un type de pollen, Ghjermana di Balagna ou Sabina, pour ne pas risquer une contamination). Le sac extérieur est retiré, un petit trou est percé sur le sac intérieur à l'aide d'une pince sur la face opposée à la fenêtre, l'embout de l'injecteur est inséré rapidement et petit à petit le pollen est pulvérisé en direction des fleurs ouvertes. A la fin de la manipulation le trou est rapidement refermé avec un morceau de ruban adhésif et le sac extérieur est remis en place. Chaque arbre est pollinisé de la même façon. Les sacs sont laissés trois semaines après la floraison, car les stigmates peuvent être encore réceptifs.

Analyse du nuage pollinique pour comprendre les évènements de fécondation :

Echantillonnage :

La parcelle située près de la commune de Lama sur laquelle l'échantillonnage est effectué est divisée en 4 sous-parcelles, toutes adjacentes les unes des autres (voir figure 2). L'échantillonnage des arbres a débuté en 2015, permettant le recensement de 61 individus. Des feuilles provenant de différents rameaux du même arbre ont été prélevées sur chacun des individus, puis envoyées à la société partenaire du projet ADNid, afin de procéder à un génotypage (voir ci-dessous). Des coordonnées GPS et un numéro sont attribués à chacun de ces arbres.

Les récoltes d'olives ont eu lieu à l'automne, 178 en 2016 sur trois arbres mères, tous de variété Ghjermana di Balagna localisés sur la sous-parcelle verte (voir Tableau 10 et Figure 2). 113 autres sont récoltées en 2017 sur cinq arbres mères, dont quatre autres représentants de la variété Ghjermana di Balagna, deux sur la sous-parcelle verte et deux sur la sous-parcelle violette, et un représentant de la variété Sabina sur la sous-parcelle violette (Tableau 2 et Figure 2). Les fruits ont été cueillis en haut, en bas et au milieu de l'arbre, dans les directions nord, sud, est et ouest, puis les embryons ont été génotypés sur le même jeu de marqueurs génétiques que les arbres adultes.

N° individu	Année	Parcelle	Variété	Nbre descendant
45	2016	Sud	Ghjermana	58
46	2016	Sud	Ghjermana	56
47	2016	Sud	Ghjermana	64
38	2017	Sud	Ghjermana	24
42	2017	Sud	Ghjermana	21
50	2017	Nord	Ghjermana	23
59	2017	Nord	Ghjermana	23
57	2017	Nord	Sabina	22

Tableau 2 : Informations concernant les mères échantillonnées : numéro d'individu, année d'échantillonnage, parcelle, variété (Ghjermana : Ghjermana di Balagna, Sabina), nombre de descendants génotypés (Nbre descendant).

Dans la continuité de l'échantillonnage entrepris les années précédentes, et afin de maximiser la probabilité d'échantillonner des arbres ayant contribué aux nuages polliniques de 2016 et 2017 (années pour lesquelles les génotypes des embryons sont disponibles), 202 individus sont marqués et cartographiés, en incluant notamment les oléastres avoisinants. Tous sont localisés par GPS. Pour 24 des 202 arbres, le risque est pris de déterminer la variété en observant le port tombant de l'arbre et la taille importante des feuilles, caractéristiques de la Ghjermana di Balagna. Pour les 178 restant, les feuilles sont prélevées pour génotypage.

Génotypage des pollinisateurs potentiels

La distinction entre les variétés d'oliviers est une tâche laborieuse lorsqu'elle n'est entreprise que sur la base de caractères morphologiques. Ainsi l'identification génétique grâce à des marqueurs microsatellites représente une méthode fiable dans le travail d'identification des variétés d'olivier. Le polymorphisme, ainsi que le caractère codominant des allèles chez les individus diploïdes, font des marqueurs microsatellites, des marqueurs génétiques de choix pour le génotypage d'individus et pour les assignations de paternité (Jarne & al., 1996). Dans le cadre de cette étude, un génotypage est réalisé par la société ADNid. Il est réalisé sur la base de 10 marqueurs microsatellites : DCA03, DCA11, DCA18, DCA8, EMO90, Gapu59, Gapu71b, DCA05, DCA09 et IAS12 (Rallo & al., 2000 ; Carriero & al., 2002 ; Rosa & al., 2002 ; Sefc & al., 2000). Pour les arbres adultes génotypés, les

	ENREGISTREMENT	EN.PE.08 6/ 12
	RAPPORT RESULTATS D'ESSAI	Date création : 08/04/05 Version : 03

résultats obtenus sont ensuite comparés à la base de données d'ADNid afin de déterminer si leur profil correspond à une variété répertoriée.

Assignment de paternité : méthode probabiliste de Marshall & al. (1998) :

Dans le contexte de cette étude, le nombre de pères potentiels est potentiellement élevé (161 arbres échantillonnés, correspondants à un nombre de génotypes uniques). C'est pourquoi l'assignation de paternité ne peut se faire sur une exclusion simple (Jones & Arden, 2003). Elle sera donc réalisée grâce à une approche probabiliste élaborée par Marshall & al en 1998. Cette méthode consiste en l'identification du père le plus vraisemblable parmi un ensemble de pères potentiels non exclus, grâce à des scores de vraisemblance basés sur leurs génotypes.

Connaissant les génotypes de la plante mère, d'un descendant focal et d'un père potentiel, deux hypothèses peuvent être soulevées :

- ⇒ le père potentiel examiné est le véritable père
- ⇒ le père potentiel est un individu quelconque de la population et n'est pas apparenté au descendant. La vraisemblance de chacune de ces deux hypothèses peut être calculée en prenant en compte les fréquences alléliques dans la population étudiée, ainsi que les probabilités de transmission mendéliennes.

Pour chaque couple descendant / père potentiel, un score de vraisemblance (LOD-score) est calculé, avec le logiciel Cervus. Si le LOD-score est supérieur à 1, le père présumé a plus de chances d'être le vrai père qu'un père pris au hasard. L'assignation ou non de la paternité à l'individu le plus vraisemblable repose ensuite sur la détermination du paramètre Δ , qui représente la différence entre le LOD-score des deux premiers mâles les plus vraisemblables. La valeur seuil de Δ au-delà de laquelle la paternité est attribuée au premier mâle est propre à chaque population étudiée, et est obtenue par simulations. Lors d'une simulation, en suivant les principes d'Hardy-Weinberg, des génotypes parentaux sont générés en fonction des fréquences alléliques observées dans la population étudiée. Ces génotypes permettent la création d'un descendant dont le génotype est produit selon les règles de transmission mendélienne. Des génotypes de pères potentiels sont également produits et le LOD-score de tous les pères potentiels, y compris le vrai père sont calculés pour chacun des descendants simulés. Les deux pères potentiels les plus vraisemblables sont ensuite identifiés grâce à leur LOD-score et le Δ est calculé. 10 000 descendants simulés sont ainsi générés, permettant donc d'obtenir une répartition des valeurs de Δ représentative de ce que l'on devrait obtenir dans la population focale. Le programme détermine ensuite la distribution des valeurs de Δ pour lesquelles la paternité a été attribuée au véritable père et celles pour lesquelles elle a été assignée à un individu quelconque. Il identifie ensuite la valeur de Δ seuil pour laquelle un certain pourcentage (correspondant à un niveau de confiance préalablement définie) du nombre de paternités ont été attribuées au véritable père. C'est cette valeur de Δ seuil qui sera utilisée lors de la véritable analyse de paternité pour décider si le Δ observé entre les deux pères les plus vraisemblables est suffisant pour assigner la paternité au père le plus vraisemblable (Marshall & al, 1998).

Dans le cadre de cette étude, un grand nombre de pères potentiels possèdent le même génotype car ils appartiennent à la même variété. Ainsi, lors des assignations, chacun des génotypes distincts sera considéré comme un père potentiel, même si ce génotype peut être présent en plusieurs exemplaires dans le jeu de données. C'est pourquoi le test ne nous permettra parfois pas d'assigner la paternité à un individu en particulier, mais à un génotype pollinisateur.

4. Résultats détaillés

Définition du groupe d'incompatibilité (G1 ou G2) de chaque variété corse par la méthode des tests stigmatiques :

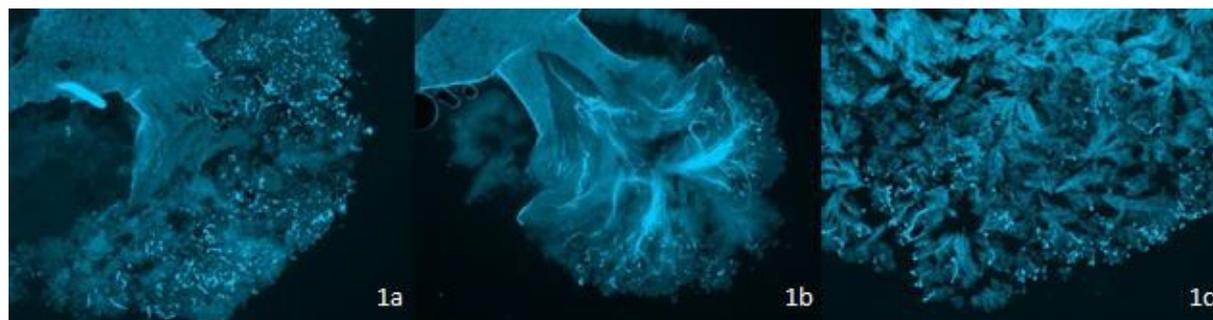


Figure 1 : Illustration des trois résultats observés lors des tests stigmatiques :

- 1a : stigmate de Ghjermana di Balagna pollinisé par Ghjermana di Balagna
- 1b : stigmate de Ghjermana di Balagna pollinisé par Sabine
- 1c : stigmate de Sabine pollinisé par Zinzala

Les tests de compatibilité stigmatique réalisés entre les cinq variétés nous révèlent trois cas de figure présentés dans la figure 1.

- (i) Les grains de pollen ne germent pas, traduisant l'incompatibilité entre le donneur et le récepteur (Figure 1a).
- (ii) La germination des grains de pollen a lieu, nous observons des tubes polliniques se regroupant en large faisceau lors de leur progression : Le pollen et le stigmate sont compatibles (Figure 1b).
- (iii) Une faible proportion des grains de pollen germe, mais la croissance du tube pollinique est stoppée relativement tôt dans sa progression, révélant une incompatibilité (Figure 1c). Ce cas de figure a été décrit lors de la caractérisation du système d'auto-incompatibilité chez *Olea europaea*. En effet chez cette espèce, la réaction d'incompatibilité diffère selon le groupe de reproduction, la croissance du tube pollinique pouvant être nulle ou partielle (Saumitou-Laprade & al., 2017).

Puisque le pollen et les stigmates de chaque variété ont prouvé leur bonne fonctionnalité dans au moins l'un des croisements compatibles, l'absence de germination peut être interprétée comme une incompatibilité. Les résultats des tests stigmatiques montrent que Ghjermana di Balagna, Sabine, Zinzala et Curtinese sont toutes auto-incompatibles et se rangent en deux groupes : un premier groupe constitué de Ghjermana di Balagna et un second de Sabine, Zinzala et Curtinese. Le groupe de reproduction de la Ghjermana di Balagna peut être inféré de la comparaison avec le génotype d'une variété italienne identique, la Frantoïo, qui a été classé G1 lors d'études antérieures (Saumitou-Laprade et al., 2017). Les résultats obtenus ci-dessus nous permettent donc de classer les variétés compatibles avec la Ghjermana di Balagna (i.e. la Sabina, la Zinzala et la Curtinese) dans le groupe de reproduction G2.

En revanche, les croisements concernant l'Aliva Nera ont été réalisés deux semaines après la récolte des stigmates et du pollen des quatre premières variétés, puisque la floraison de cette dernière a tardé par rapport à celle des autres. Les croisements impliquant les stigmates récoltés en début d'expérience et le pollen de l'Aliva Nera sont tous négatifs alors que les croisements impliquant les stigmates de l'Aliva Nera et le pollen des autres variétés peuvent être interprétés de manière classique et rangent l'Aliva Nera dans le même groupe que Ghjermana di Balagna : groupe G1. Le risque de perte de réceptivité stigmatique dans le temps qui apparaît très clairement dans notre test diallèle est une cause majeure d'erreur dans l'assignation d'incompatibilité (Saumitou-Laprade 2017). Ainsi nous avons choisi de ne pas intégrer les résultats des croisements impliquant Aliva Nera dans la tableau ci-dessous. L'observation de la germination ou de l'absence de germination des grains de pollen sur chaque stigmate dans le test diallèle est résumée dans le tableau ci-dessous.

		Génotypes donneurs de pollen			
		Ghjermana	Sabina	Zinzala	Curtinese
Génotypes receveurs de pollen	Ghjermana	0	1	1	1
	Sabina	1	0	0	0
	Zinzala	1	0	0	0
	Curtinese	1	0	0	0

Tableau 3 : Résultats des tests stigmatiques effectués sous forme de diallèle impliquant quatre variétés corses d'olivier. Les chiffres indiquent les statuts de compatibilité (0 = pas de germination ; 1 = germination)

Les résultats des croisements obtenus à l'issue des tests stigmatiques étendent les conclusions de Saumitou-Laprade & al. (2017) sur l'existence de deux groupes de reproduction inter-compatibles à cinq variétés corses qui n'avaient pas été testées précédemment. Les croisements intra-variétés et les autofécondations sont bien incompatibles. L'ambiguïté décrite par les mêmes auteurs concernant la germination partielle du pollen G2 sur un stigmate de la même variété est également retrouvée pour tous les tests incompatibles impliquant ce groupe. Des tests impliquant l'Aliva Nera seront cependant à réitérer afin de confirmer son assignation dans le groupe G1 ainsi que son auto-incompatibilité avec plus de confiance.

Vérification de la compatibilité identifiée lors des tests stigmatiques par des croisements contrôlés, et impact sur la production de fruits.

Trois semaines après la fin de la floraison, les sacs d'isolement ont été remplacés par des sacs en filet pour récupérer les fruits tombés en cours de maturation, faciliter la récolte des fruits et les protéger des ravageurs. Le nombre de fruits tombés au fil des mois a été noté pour estimer la capacité du père testé à produire des fruits sains arrivant à maturation complète (cf tableau 4 page suivante). En 2019, les embryons d'une partie de ces olives seront génotypés et une analyse de paternité sera menée, afin d'écarter la possibilité de pollinisation par contamination (i.e. par un père autre que celui testé) ou de détecter les éventuelles autofécondations.

juin-18				Comptage du 18/07/18						Comptage du 14/09/18						
Mère		Père		Supression sac et installation insect-proof	Sur le rameau				Dans le sac	Total	Sur le rameau				Dans le sac	Total
N°	Variété	N°	Variété		Normale	Petites	sèches	Total	Tombées		Normale	Petites	sèches	Total	Tombées	
431	Sabine 95 %	447	Ghjermana di Balagna 100 %	65	63	0	1	64	1	65	66	0	2	68	4	72
431	Sabine 95 %	435	Sabine 100 %	4	6	1	0	7	0	7	6	1	0	7	0	7
430	Sabine 95 %	446	Ghjermana di Balagna 100 %	23	16	2	3	21	2	23	14	5	1	20	1	21
430	Sabine 95 %	431	Sabine 95 %	15	0	0	0	0	10	10	Sac disparu (certainement à cause du vent)					
435	Sabine 100 %	442	Ghjermana di Balagna 100 %	44	47	0	0	47	1	48	Branche cassée par le vent. Toutes les olives sont sèches. Il est donc impossible de génotyper les embryons et de faire la paternité					
435	Sabine 100 %	430	Sabine 95 %	5	3	0	0	3	2	5	51	3	0	54	3	57
442	Ghjermana di Balagna 100 %	435	Sabine 100 %	52	52	0	0	52	0	52	71	2	0	73	1	74
442	Ghjermana di Balagna 100 %	447	Ghjermana di Balagna 100 %	218	72	2	0	74	2	76	41	6	0	47	3	50
446	Ghjermana di Balagna 100 %	431	Sabine 95 %	73	46	0	0	46	0	46	9	2	0	11	0	11
446	Ghjermana di Balagna 100 %	442	Ghjermana di Balagna 100 %	14	0	0	0	0	14	14	0	0	0	0	0	0
446	Ghjermana di Balagna 100 %	446	Ghjermana di Balagna 100 %	14	11	0	0	11	0	11	0	0	0	0	0	0
447	Ghjermana di Balagna 100 %	447	Ghjermana di Balagna 100 %					0		0	0	0	0	0	0	0
447	Ghjermana di Balagna 100 %	430	Sabine 95 %	64	31	0	0	31	35	66	24	0	0	24	5	29
447	Ghjermana di Balagna 100 %	446	Ghjermana di Balagna 100 %	24	29	0	0	29	0	29	0	0	0	0	0	0
447	Ghjermana di Balagna 100 %	447	Ghjermana di Balagna 100 %	27				0		0	0	0	0	0	0	0
447	Ghjermana di Balagna 100 %	447	Ghjermana di Balagna 100 %	258	12	88	2	102	12	114	12	0	62	74	28	102

Tableau 4 : Bilan de la récolte des olives dans les sacs d'isolement des tests post-zygotique

Analyse du nuage pollinique pour comprendre les évènements de fécondation :

Les points GPS attribués à chaque arbre ont été utilisés pour réaliser une carte de la parcelle à l'aide du logiciel de cartographie Qgis 2. 18. 18.

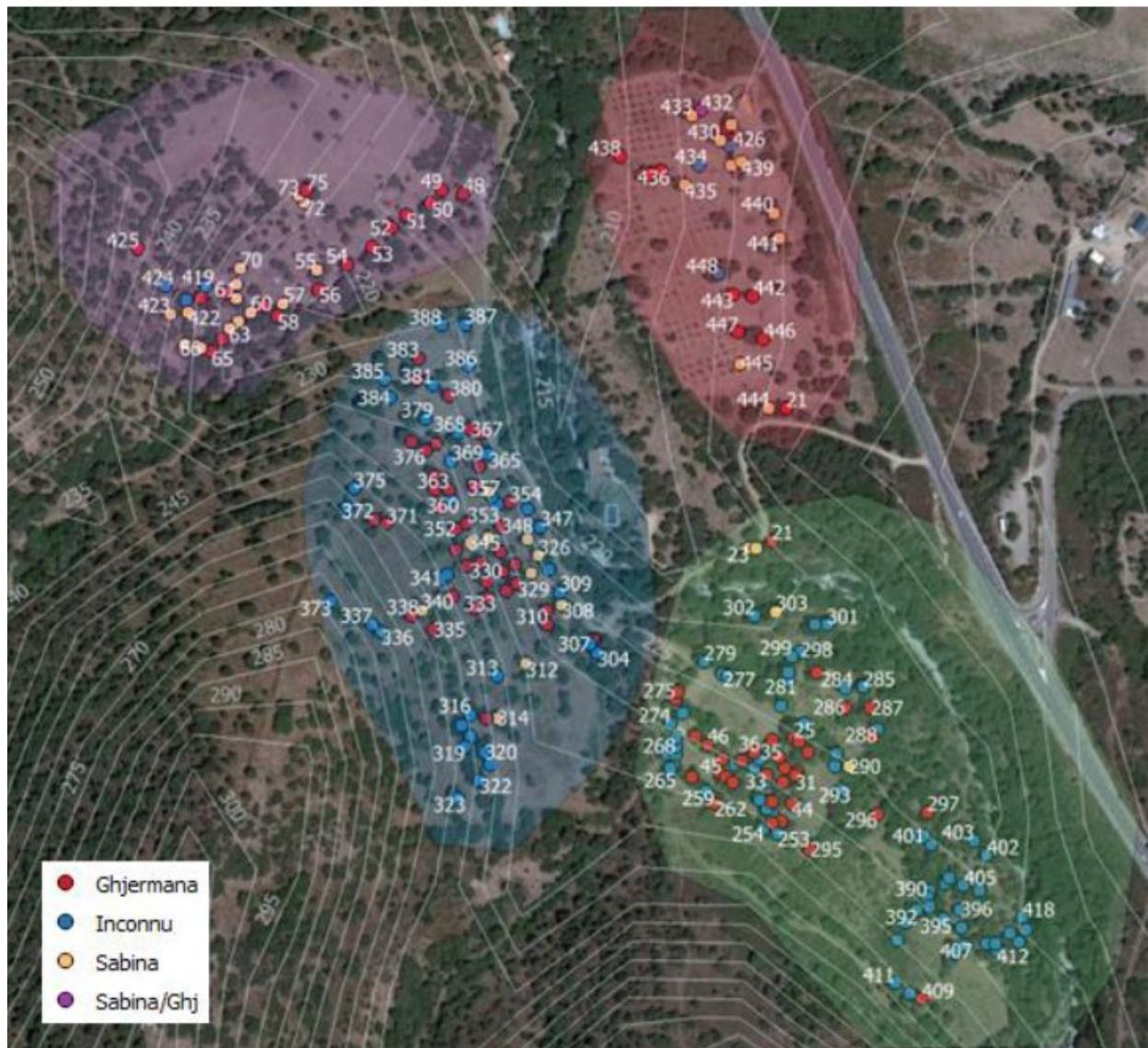


Figure 2 : Cartographie des individus échantillonnés (2015 à 2018) dans le verger de Lama positionnés dans différentes sous-parcelles (Sabina/Ghj = les variétés Sabina et Ghjermana di Balagna ont été greffées sur le même porte-greffe)

La carte créée à partir des données des années précédentes et de cette année (178 individus génotypés cette année) révèle des informations sur l'occurrence de chaque variété sur les quatre parcelles (Figure 2 ci-dessus).

- ⇒ La sous-parcelle en vert est composée majoritairement d'oléastres, oliviers ou oliviers féraux dont le génotype s'avère non répertorié dans la base de données d'ADNid (63%), d'un grand nombre d'arbres de la variété Ghjermana di Balagna (33%) et de quelques arbres de génotypes Sabina (4%).
- ⇒ Dans la sous-parcelle violette se trouve un plus grand nombre d'arbres génotypés de la variété Sabina (41%), ainsi que beaucoup d'arbres Ghjermana di Balagna (50%) et quelques arbres de génotypes non répertoriés (9%), ce qui est également le cas dans la sous-parcelle rouge (respectivement 46%, 41,5% et 12,5%).
- ⇒ Sur la sous-parcelle bleue se trouve également un fort nombre d'individus Ghjermana di Balagna (46,5%) et d'oléastres (41,5%), et quelques individus Sabines (12%).

Description de la population génotypée

Dans la population focale, la probabilité d'identité (probabilité d'obtenir deux fois le même génotype par hasard, qui est fonction du nombre d'allèles et de leurs fréquences) est de 1.6×10^{-10} . La recherche des génotypes identiques a permis de noter la présence de clones, ce qui n'est pas surprenant au vu du mode de multiplication de l'olivier. Ces clones correspondent notamment aux deux variétés cultivées localement, Ghjermana di Balagna et Sabina. Des variants de ces deux variétés ont également été identifiés (avec un allèle différent sur les dix locus), avec deux génotypes distincts de Ghjermana di Balagna et quatre génotypes Sabina. Le premier génotype Ghjermana di Balagna est le plus représenté sur toutes les parcelles, à raison de 54 individus et correspond à celui répertorié dans la base de données d'ADNid. Le deuxième génotype, n'est présent qu'une fois. Le génotype Sabina le plus représenté (Sabina-1) est présent 22 fois, la Sabina-2 est représenté par 8 individus, la Sabina-3 comprend 2 individus et la Sabina-4 est unique. Ces différences entre arbres de la même variété, possiblement due à des mutations somatiques, sont prises en compte et considérées comme des génotypes uniques pour la suite des analyses. Un génotype inconnu, le 263, est également représenté par 3 individus, possédant tous un morphotype d'oléastre. Au total 73 génotypes uniques sont obtenus : deux Ghjermana di Balagna, quatre Sabina et 67 génotypes non répertoriés dans la base de données d'ADNid. Parmi les génotypes non référencés, 46 correspondent à des arbres présentant un profil d'oléastre et 21 présentent un phénotype difficile à déterminer du fait de leur ressemblance avec des oliviers.

Le génotypage des arbres a révélé que chacun des oléastres possédait un génotype unique. Ceci semble indiquer que les oléastres n'ont pas été multipliés, mais issus de croisements avant ou après la création du verger. Les variations génotypiques observées au sein des individus Sabina et Ghjermana di Balagna pourraient être dues à des mutations somatiques, et puisque l'olivier est multiplié par greffage, cela pourrait expliquer que certains de ces génotypes sont représentés par plusieurs individus, notamment chez la Sabine.

Parmi les génotypes non répertoriés dans la base de données d'ADNid, 11 possèdent un morphotype d'oléastre et sont à l'origine de nombreux descendants, notamment l'arbre 273. Environ 1200 variétés d'oliviers ont été à ce jour caractérisées (Hmnam et al. 2018), ces arbres peuvent ainsi être des oliviers dont ADNid ne possède pas le génotype, mais également des oliviers féraux.

L'étude des différents paramètres calculés pour chaque locus, révèle que le locus EMO90 est le seul à présenter un faible polymorphisme et une faible d'hétérozygotie attendue, ainsi qu'une valeur de FIS significativement positive et une forte probabilité de non-exclusion. Un locus possédant de nombreux allèles équifréquents sera plus utile lors d'analyse de paternité en facilitant les assignations. EMO90 est donc globalement peu informatif sur le verger étudié, ce qui est reflété dans la forte valeur de probabilité de non-exclusion. Par ailleurs, la valeur élevée du FIS observée uniquement à ce locus particulier pourrait être due à la présence d'allèles nuls. Un allèle nul correspond à un allèle non détecté lors de la PCR, ce qui entraîne la formation de "faux-homozygotes" pour le locus concerné. La présence d'allèles nuls est problématique lors de l'assignation de paternité (les génotypes des descendants et des pères potentiels observés étant potentiellement faux). Pris ensemble, ces éléments soulèvent des questions sur l'utilité de ce marqueur particulier, qui devra éventuellement être mis de côté pour ce type d'analyses dans le futur.

Assignations de paternité

Lors des assignations de paternité pour les 291 embryons inclus dans cette étude, plusieurs cas de figures sont observables :

1. L'embryon est assigné au seuil de 80% ou plus, le meilleur candidat est vraisemblablement le vrai père. 195 descendants sont dans ce cas.
2. L'embryon n'est pas assigné et possède 2 allèles ou plus non concordant(s) avec le meilleur père potentiel. Le véritable père n'a vraisemblablement pas été échantillonné, et correspond soit à un arbre non-

échantillonné sur le site d'étude, soit à un père localisé en dehors du site d'étude. Ce cas concerne 56 descendants.

3. L'embryon n'est pas assigné car les meilleurs pères potentiels possèdent le même génotype à un allèle près (ce type de variation est observé pour les deux variétés communes dans le site d'étude). Le meilleur génotype paternel ne peut pas être discriminé, mais appartient à ce groupe de variants de la même variété. Le troisième cas de figure est observé pour 40 descendants sur 96 non assignés, Pour ces embryons, nous avons donc assignés non pas un génotype paternel mais le nom de la variété à laquelle le groupe de clones appartient.

Un génotype paternel est ainsi attribué à 235 des 291 descendants, ce qui représente environ 80% des embryons testés.

Mères Ghjermana di Balagna :

- ⇒ 37,6% des embryons assignés sont issus de pères de génotype Sabina, principalement la Sabina-1.
- ⇒ 54,4% des embryons assignés sont attribués à des individus de génotype non répertorié, qui correspondent majoritairement à des oléastres.

Finalement, environ 8% des assignations sont attribuées à des individus dont le génotype correspond à la variété Ghjermana di Balagna de type 1. La proportion d'assignation d'embryons de la même année à des pères de génotype Sabine est plus importante pour ceux issus des mères 50 et 59 (66,6% et 80%) située dans la sous-parcelle du nord (parcelle violette, Figure 3), que pour ceux issus des mères 42 et 38 (35,7% et 11%) située dans la sous-parcelle sud (parcelle verte, Figure 3). Les embryons issus des mères localement proches, située dans la sous-parcelle violette (i.e. les mères 45, 46, 47, 38 et 42) sont assignés en plus grand nombre à des génotypes inconnus et ce pour les cinq mères, toutes années confondues.

Mères Sabina :

- ⇒ 63% des descendants assignés sont issus de père possédant le génotype Ghjermana di Balagna de type 1.
- ⇒ 37% sont issus de pères au génotype non répertorié.

Génotypes pollinisateurs : Toutes années confondues, 44 génotypes sur 73 retrouvés sur la parcelle sont à l'origine d'un ou plusieurs embryons. Le nombre de descendants attribués par année et par génotype varie de 38 à 1 embryon. 24 génotypes, tous inconnus, ont été assignés une seule fois. Le génotype assigné le plus grand nombre de fois à un embryon est l'arbre 273, avec 35% des assignations de descendants issus de mère 45, 46 et 47 (i.e. Ghjermana di Balagna) en 2016. Cet arbre possède un morphotype d'olivier, mais son génotype est unique dans le verger. Le génotype Sabina-1, le plus représenté sur toute la parcelle, est le génotype Sabina à l'origine du plus grand nombre de descendants.

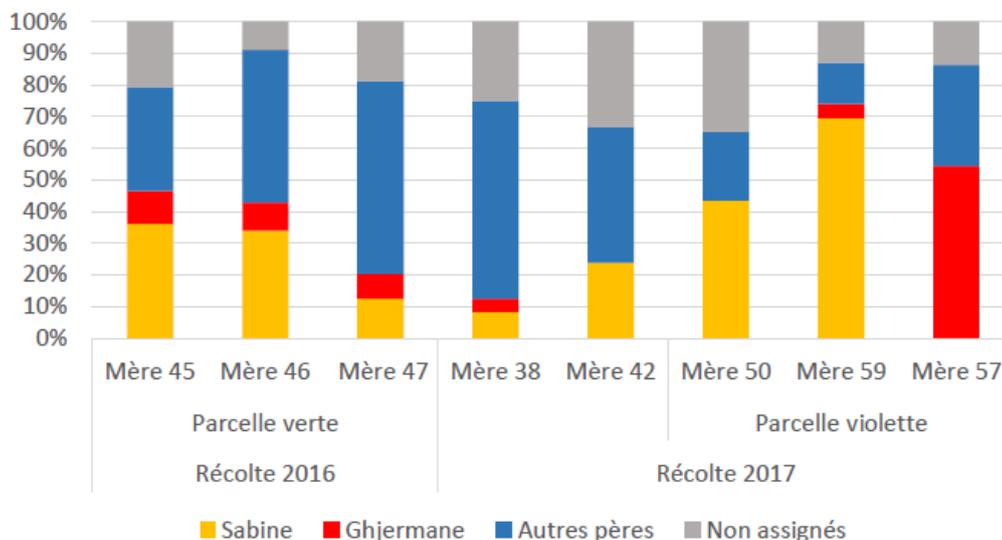


Figure 3 : Diagramme représentant les proportions d'assignations par type de père (Sabine, Ghjermana de Balagna, autre pères) ainsi que la proportion de descendants non-assignés pour les huit plantes mères échantillonnées en 2016 et 2017

Le pourcentage élevé d'assignation obtenu indique que l'effort d'échantillonnage effectué dans le but de trouver les génotypes pollinisateurs de la Ghjermana di Balagna semble avoir été efficace. Il reste cependant des individus non

	ENREGISTREMENT	EN.PE.08	11/
	RAPPORT RESULTATS D'ESSAI	Date création : 08/04/05 Version : 03	12

assignés et des descendants possédant des allèles allochtones à la population d'arbres étudiée, dont le père est soit présent dans le verger, mais n'a pas été échantillonné, soit présent à l'extérieur du verger. Une nouvelle analyse de paternité pourra donc être réalisée, lorsque les génotypes échantillonnés cette année mais non génotypés, seront disponibles.

Globalement, la proportion d'assignation de paternité à de pères de génotypes Sabina est plus faible que celle de génotypes non répertoriés, mais le nombre d'individus Sabina est plus faible que les nombre d'oléastres présents dans le verger. Les individus Sabines étaient donc de bons pollinisateurs des arbres Ghjermana di Balagna, les années au cours desquelles les olives ont été récoltées, du fait de leur compatibilité. Le fait que les pères de variété Sabina contribuent de façon importante à la pollinisation des mères Ghjermana di Balagna indique que la floraison de ces deux variétés était synchrone, au moins sur les deux années étudiées. Cependant, cette année, un décalage partiel de deux semaines a pu être observé entre ces deux variétés, potentiellement causé par les mauvaises conditions météorologiques. L'arbre 273 semble avoir également été bien synchronisé en 2016 et 2017 aux vues du nombre de descendants qui lui ont été assignés.

L'assignation de nombreux descendants à des pères de génotypes non identifiés révèle deux informations importantes. Tout d'abord, cela signifie que les oléastres présents sur ces parcelles participent au nuage pollinique à l'origine de la production d'olives. Ce schéma peut donc être retrouvé dans d'autres vergers, dès lors que des oléastres sont à proximité. Deuxièmement, ces génotypes inconnus correspondent à des arbres uniques, dont la distance avec les mères est connue, ce qui permet d'émettre une idée très générale de la distance de pollinisation. Globalement les mères sont fécondées par des pères proches d'elles, sauf quelques exceptions qui concerne principalement des arbres situés au nord, dans le couloir de vent. La proportion d'assignations de génotypes Sabina par rapport au génotypes inconnus varie selon les mères Ghjermana di Balagna étudiées et selon leur proximité avec des arbres Sabina. Cette différence entre mères situées dans les deux sous-parcelles étudiées pourrait être due à la différence d'occurrence du génotype Sabina entre les deux sous-parcelles. Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus lors de l'étude de la structuration du nuage pollinique : le pollen semble voyager au sein du verger, mais la plupart des événements de fécondation ont lieu grâce à du pollen localement disponible.

D'une année à l'autre, la proportion de pères Sabina assignés semble plus faible pour des mères situées sur la même parcelle. Ceci pourrait être dû au phénomène d'alternance de floraison : une année sur deux, la floraison est moins conséquente car les ressources sont allouées à la croissance de l'arbre (Breton & al., 2012). Cependant, les embryons n'étant pas récoltés sur les mêmes mères, cette variation peut être dû à des effets individuels ou à des effets spatiaux.

Les quatre génotypes différents de Sabina sont retrouvés lors des assignations d'embryons récoltés sur les mères Ghjermana di Balagna. Ceci indique que les variations moléculaires observées au niveau d'un allèle microsatellite entre les génotypes Sabine n'impactent pas ses caractéristiques d'incompatibilité.

Pour cinq des mères Ghjermana di Balagna échantillonnées, un petit nombre d'embryons est assignés à des pères de même génotype (5% en moyenne). Les tests stigmatiques ont révélé l'auto-incompatibilité de cette variété, cependant chez certaines variétés d'olivier, l'autofécondation ou la fécondation intra-variétale peut avoir lieu en faible proportion. Dans ce cas l'auto-incompatibilité est qualifiée de non étanche « (en anglais « leaky ») (Saumitou-Laprade & al.). Les résultats d'assignations obtenus pour l'unique mère Sabina vont dans le sens des conclusions émises sur la compatibilité des variétés. Ainsi, la Ghjermana di Balagna est également un bon pollinisateur de la Sabina. Aucun embryon génotypés n'est attribués à un génotype Sabina, comme c'était le cas pour certains embryons issus des mères Ghjermana di Balagna, mais puisque le nombre d'olives récoltées est faible pour cette mère, il n'est pas exclu que des événements d'autofécondation aient eu lieu.

5. Conclusion

Les différentes études réalisées ont permis d'obtenir de nombreuses informations sur la pollinisation des oliviers dans le verger étudié. Premièrement, la variété Sabina est un pollinisateur efficace de la variété Ghjermana di Balagna, du fait de sa compatibilité et de la synchronisation de sa floraison. Deuxièmement, les oléastres participent à la composition du nuage pollinique à l'origine de la production de fruit récoltés deux années consécutives. Ainsi dans les vieux vergers comme celui étudié, les oléastres naturellement présents peuvent apporter une contribution non-négligeable au nuage pollinique local. Enfin, cette étude a également révélé que la fécondation avait lieu grâce au pollen d'individus proches.

	ENREGISTREMENT	EN.PE.08	12/
	RAPPORT RESULTATS D'ESSAI	Date création : 08/04/05	12
		Version : 03	

Au sein des jeunes vergers monovariétaux, l'apport de pollen est assuré par des variétés pollinisatrices à hauteur de 5% du nombre de pieds du verger, ne possédant pas l'appellation, dont les olives ne sont pas utilisées dans la production d'huile. La variété Sabina est classée dans l'AOC, et cultivée pour son huile, donc son introduction en nombre important dans les vergers de Ghjermana di Balagna permettrait un apport de pollen compatible, sans perte de production. Cependant cette année une désynchronisation de la floraison, potentiellement liée aux conditions climatiques particulières, a pu être observée entre ces deux variétés. Pour anticiper ce type de phénomène, il peut être intéressant d'introduire d'autres génotypes pollinisateurs. L'arbre 273 est intéressant puisque sa période de floraison semble être synchrone avec celle de la Ghjermana di Balagna.