

Compte-rendu 2016

Impact de la polyploïdie du porte-greffe sur la tolérance au déficit hydrique

Date : 27 février 2016

Rédacteur(s) : Gilles Paolacci – Paul Martin

Cadre de la proposition

Dans le cadre d'un projet CTPS (2014-2016), mais également du projet Feder Corse « Porte-greffe » (2015-2016), l'AREFLEC s'est fortement impliqué pour évaluer les propriétés de tolérance au stress de nouveaux porte-greffes tétraploïdes. En partenariat avec le CIRAD, l'INRA mais également l'Université de Corse, des travaux ont ainsi été menés sur l'adaptation de ce matériel innovant face aux contraintes froid et nutritionnelles. Les premiers résultats obtenus en serre montrent que ce matériel tétraploïde présente une meilleure capacité d'adaptation. De même, les travaux initiés en Guadeloupe par le CIRAD montrent que ces porte-greffes sont plus tolérants au Huanglongbing, maladie qui ravage l'agrumiculture notamment au Brésil, en Floride mais également dans toute la Caraïbe.

Avec les changements climatiques annoncés, la problématique sécheresse sera de plus en plus forte en Corse et l'ensemble de la méditerranée. Nous disposons d'un essai au champ où est planté un porte-greffe tétraploïde (le Flhorag1) et ses deux parents diploïdes. Les premières évaluations réalisées par l'AREFLEC montrent que le Flhorag1 se comporte bien (qualité fruit) lorsque greffé avec de l'oranger et du clémentinier. Il est escompté que le Flhorag1 présente une meilleure adaptation à la sécheresse, conduisant *in fine* à un impact moindre sur la qualité des productions.

Enjeux scientifiques

La polyploïdisation est un phénomène naturel chez les plantes à multiplication végétative telles que les agrumes (Dambier et al., 2011). Chez les porte-greffes, la polyploïdisation conduit à une augmentation de la taille des cellules et des organes (Allario et al. 2011) et à un changement du métabolisme carboné de la variété greffé dessus (Hussain et al., 2012). Les différences anatomiques et morphologiques observées chez les agrumes tétraploïdes peuvent conduire à une diminution de croissance et de développement des plants tétraploïdes (Allario et al., 2011). Des génotypes triploïdes sont également couramment sélectionnés dans le cadre des programmes de sélections variétales et peuvent présenter une différenciation phénotypique importante. Toutefois, on ne connaît pas les déterminants physiologiques pouvant être à l'origine des différences de croissance, de développement, de rendement ou d'adaptation au stress. Des travaux récents ont montré que la polyploïdisation permet une meilleure adaptation aux contraintes environnementales. Les porte-greffes tétraploïdes d'agrumes franc de pied sont plus tolérants au stress salin et au déficit hydrique que les diploïdes (Saleh et al., 2008 ; Mouhaya et al., 2008, Ruiz et al, 2016 a,b). Une tolérance accrue au déficit hydrique a également été observée lorsque les porte-greffes tétraploïdes sont greffés (Allario et al. 2013, de Oliveira et al. 2016). De même, il a été montré que les systèmes de détoxication chez les polyplloïdes sont plus efficaces que chez les diploïdes (Zhang et al. 2010 ; Deng et al., 2012). Les travaux préliminaires que nous avons réalisés en situation de déficit hydrique sur des porte-greffes tétraploïdes franc de pied (de Oliveira et al 2016) mais également chez du clémentinier greffé sur un porte-greffe tétraploïde (Oustric et al, en préparation) soumis à une contrainte au froid tendent à confirmer ces résultats.

Dans le cadre de cet essai, il est proposé d'évaluer la tolérance à la sécheresse d'un porte-greffe tétraploïde (le Flhorag1) et de ses parents diploïdes (le Poncirus Pomeroy et le mandarinier commun) greffés avec du clémentinier. Afin d'exploiter efficacement une éventuelle composante de la polyploïdie du porte-greffe sur la tolérance au déficit hydrique différents paramètres physiologiques des arbres au champ vont être évalués. De même, le rendement et la qualité des productions vont être évalués sur le déficit hydrique.

Références bibliographiques:

Allario T., Brumos J., Colmenero-Flores JM, Tadeo F, Froelicher Y., Talon M., Navarro L., Ollitrault P., Morillon R. (2011). Large changes in anatomy and physiology between diploid Rangpur lime (*Citrus limonia*) and its autotetraploid are not associated with large changes in leaf gene expression. *Journal of Experimental Botany*. 62: 2507-2519.

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.

Dambier D, Benyahia H, Pensabene-Bellavia G, Aka Kacar Y, Froelicher Y, Belfalah Z, Beniken Lhou, Handaji N, Printz B, Morillon R, Yesiloglu T, Navarro L, Ollitrault P (2011). Somatic hybridization for Citrus rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant Cells Report*. Special issue on Biotechnology in Support of the Millenium Development Goals. 30: 883-900

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 H₂O₂ scavenging. *Accepté pour publication. Acta Physiologia Plantarum*.

Deng B, Du W, Liu C, Sun W, Tian S, Dong H. (2012) Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids? *J Plant Growth Regul* ;66:1-37.

Franks PJ, Beerling DJ. 2009. Maximum leaf conductance driven by CO₂ effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106, 10343-10347.

Mouhaya W, Allario T, Brumos J, Andrés F, Froelicher Y, Luro F, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (2010) Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes. *Functional Plant Biology*, 37: 674-685

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, Martinez Alcantara 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.

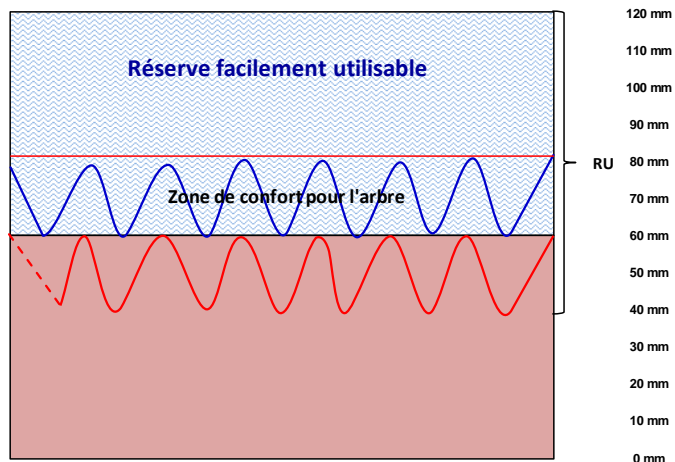
Zhang XY, Hu CG, Yao JL. (2010) Tetraploidization of diploid *Dioscorea* results in activation of the antioxidant defense system and increased heat tolerance. *J. Plant Physiol*. 167: 88-94.

Buts de l'essai

- Évaluer le comportement du porte-greffe tétraploïde (4x) *FLHORAG 1*, comparé aux porte-greffes diploïdes (2x) en condition de stress hydrique.
- Évaluer l'impact du stress hydrique sur le rendement, le pourcentage de fruits par classe de calibre ainsi que sur la qualité interne des fruits, sur la clémentine commune (SRA 92) greffée sur des porte-greffes 4x et 2x.

Protocole d'expérimentation :

- Deux lignes indépendantes : Système d'irrigation par micro-jet associé à des volucompteurs pour vérifier le volume d'eau apporté.
- Irrigation 100 % de l'ETP, à partir de la RU, ligne non stressée.
- Irrigation 70 % de l'ETP, à partir de la RU, ligne stressée.



Irrigation en fonction de l'ETP

ETP x K x Nbrs de jours

- 100% ETP
- 70% ETP

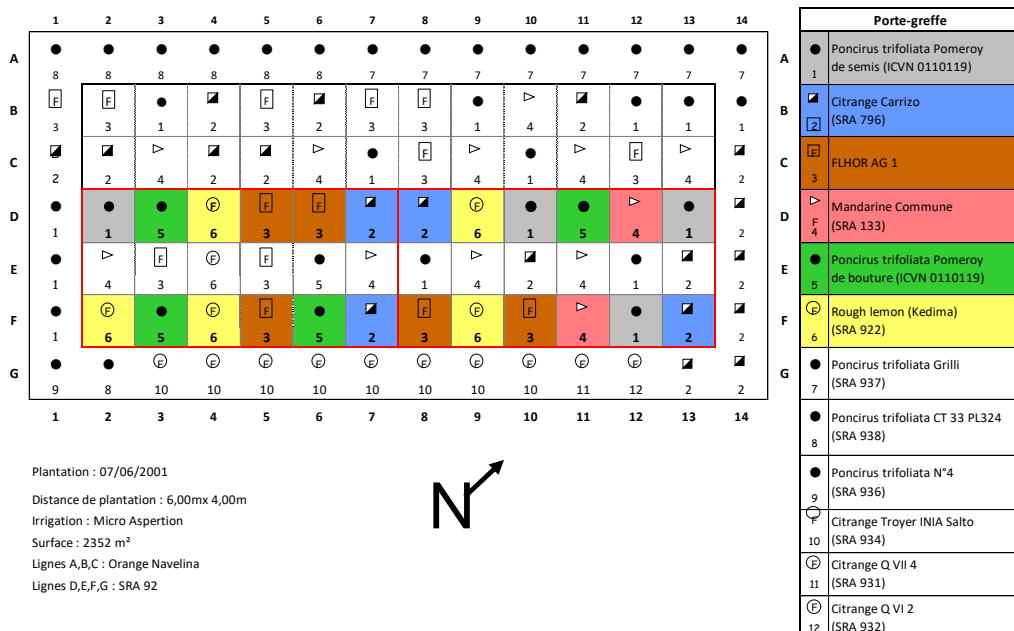
Dispositif expérimental :

- Implantation sur le domaine expérimental de l'UE Citrus de l'INRA de San Giuliano.

	Enregistrement	EN.RE.02
	Plan essai	Version : 00
		Date de création : 17/06/2005

Nom de la parcelle : C.9.B.2.a

Date de saisie : 13/02/2016



Matériel Végétal :

Clone de clémentinier (SRA 92) :

Porte-greffes :

- + Poncirus trifoliata pomey de semis (2x)
- + Citrange Carrizo (2x)
- + FLHOR AG 1 (4x)
- + Mandarine commune (2x)
- + Poncirus trifoliata Pomey de bouture (2x)
- + Rough lemon (Kedima) (2x)

Paramètres observés :

Analyse de la vigueur :

Variété/porte-greffe pour chaque combinaison : affinité, indice de productivité;

Caractériser l'impact de la polyploïdie (Flhorag1 versus ses 2 parents diploïdes) sur la floraison :

- + Pour chaque combinaison, à la pleine floraison une note de floribondité ou d'intensité de floraison est attribuée à chaque arbre. Notation de 1 à 5 : 1 très faible floraison, 2 faible, 3 moyenne, 4 forte, 5 très forte floraison ;

Coloration des fruits :

- + Suivi de l'évolution de la coloration des fruits, toutes les semaines à partir de fin octobre ;

Analyses physico-chimiques :

- + Prélever un échantillon de 20 fruits de calibre (3) toutes les semaines à des fins d'analyses, Acidité, taux de jus, % de matière sèche soluble en % degrés BRIX;

Caractérisation du stress hydrique imposé :

Paramètres mesurés après la chute physiologique :

Toutes les semaines :

- + La **fluorescence chlorophyllienne** : elle est obtenue sous forme d'un rapport F_v/F_m , qui nous indique si la chlorophylle fonctionne bien. On place donc une pince opaque ayant pour but de mettre une région de la feuille dans le noir pendant un certain temps, puis, en envoyant un flash lumineux sur cette zone, on mesure la fluorescence. On utilise le HANDY PEA pour effectuer ces mesures.
- + L'**évaluation de la fuite d'électrolytes** : est obtenue par le conductimètre FiveEasy™ Plus. On découpe un bout de feuille qu'on rince, ensuite on plonge l'échantillon dans un tube contenant 8 ml d'eau distillée. La première lecture de fuite d'électrolyte se fait 24h après le dépôt du morceau de feuille dans le tube. Une fois la première lecture effectuée, les tubes passent à l'autoclave pour libérer tous les électrolytes, puis on fait la deuxième lecture. Cette lecture, nous permet d'évaluer indirectement le stress, puisqu'il provoque une instabilité des membranes.

Une seule fois au début du mois d'août :

- + **Mesure du taux d'humidité** : Prélèvements de terre sur la parcelle pour les deux modalités concernées, à des profondeurs différentes. Puis tamisage de la terre des différents échantillons. Après avoir mélangé les prélèvements de terre pour chaque modalité, 500 grammes de terre sont disposés dans un bocal en verre et mis dans une étuve à une température de 120°C pendant 24 heures, cette opération est renouvelée autant de

fois que cela est nécessaire, afin d'obtenir une masse identique à la précédente pesée, cela nous permet de mettre en évidence qu'il n'y a plus d'humidité dans l'échantillon.

Avant la récolte :

- ✚ Evaluation de la production des arbres pour chaque combinaison, une note de 1 à 5 est attribuée à chaque combinaison; 1 très faible production, 2 faible, 3 moyenne, 4 forte, 5 très forte production;

A la récolte :

- ✚ Récolte des fruits suivant la norme IGP, arbre par arbre en deux passages minimum;

Le calibrage :

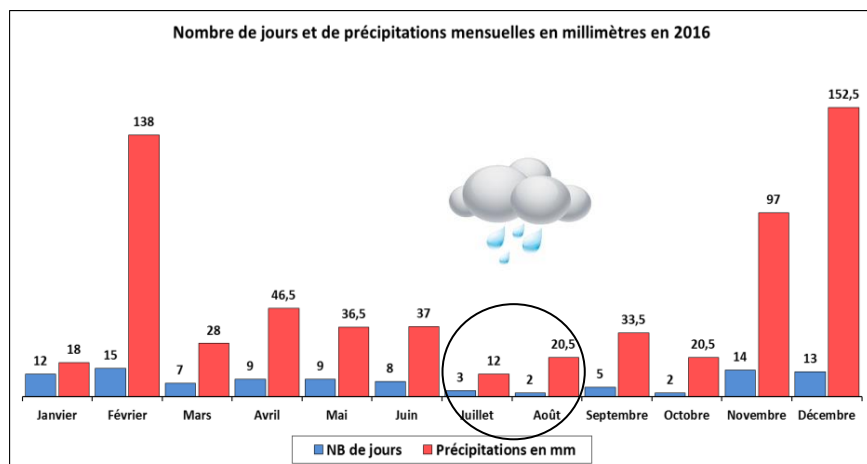
- ✚ Calibrage des fruits arbre par arbre suivant les normes en vigueur.
- ✚ Un échantillon de 20 fruits minimum de calibre 3 est prélevé à des fins d'analyses, Acidité, taux de jus, % de matière sèche soluble exprimé en % degrés BRIX;

Les paramètres Analysés :

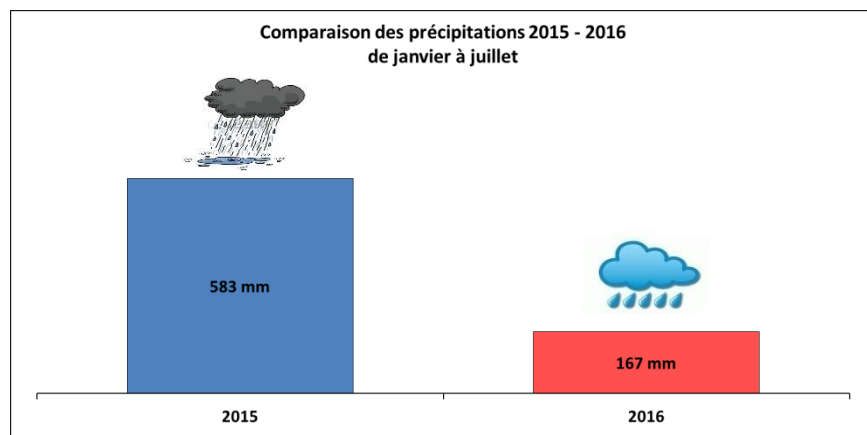
- ✚ Rendements;
- ✚ % de fruits par classes de calibre;
- ✚ Acidité;
- ✚ % de matière sèche soluble en exprimé en % degrés Brix;
- ✚ Taux de jus.

Bilan climatique :

La pluviométrie :



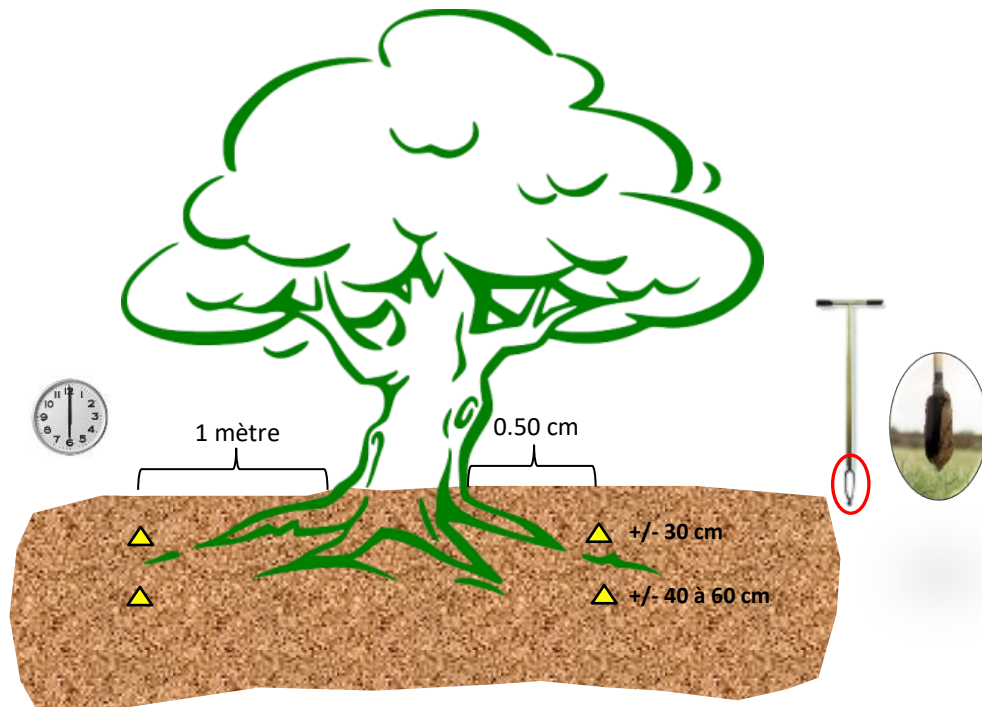
Comme on peut le voir sur le graphique, il a plu au mois de juillet et août, ces faibles précipitations (de 12 et 20.5 millimètres) n'ont eu aucune incidence sur le bon déroulement de notre essai. Les faibles précipitations ont eu lieu au début du mois de juillet, et à la fin du mois d'août, hors période de stress.



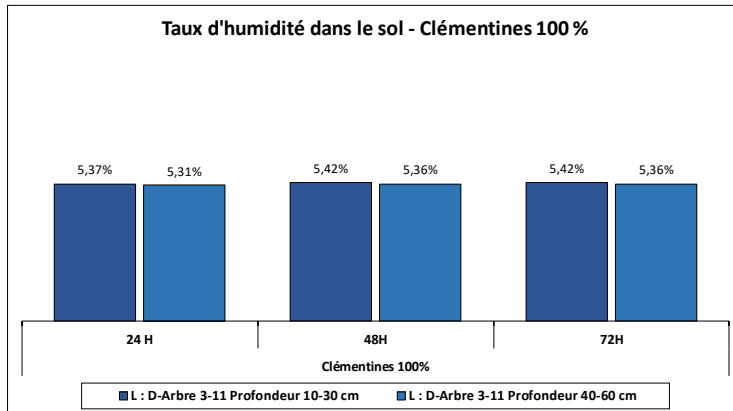
Pour l'année 2015 (voir graphique de gauche), les précipitations cumulées de janvier à juillet sont de 583 millimètres, en 2016 pour la même période elles sont de 167 millimètres, soit un déficit cumulé de 416 millimètres.

Cela n'a pas affecté le bon déroulement de l'essai. Les très faibles précipitations enregistrées au début du mois de juillet et à la fin août, ont eu lieu soit avant soit après la période de stress.

Les prélèvements de la terre par modalité :

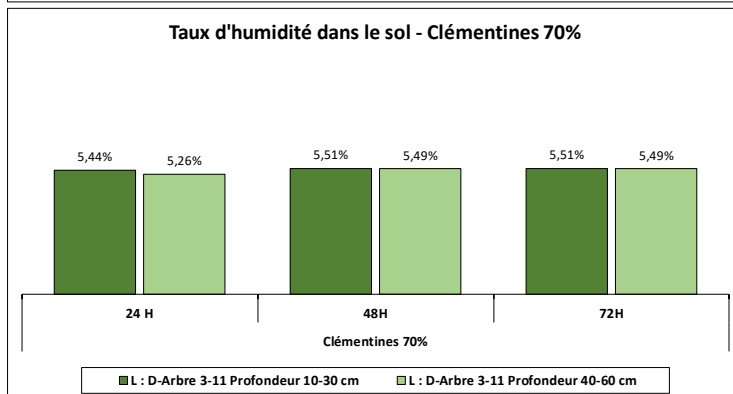


Résultats : Sur le taux d'humidité du sol à différentes profondeurs :



Pour les deux modalités observées, Les échantillons de terre prélevés à une profondeur comprise entre 10-30 cm, ont un taux d'humidité légèrement supérieur à ceux prélevés à une profondeur de 40 à 60 cm, cette différence est cependant assez peu marquée.

Si l'on compare ensuite, les échantillons de terre, de la modalité 100% irrigation ETP à la modalité 70 %, on constate qu'il n'y a pas de différence très marquée, le taux d'humidité dans le sol est quasiment le même pour les deux modes d'irrigation.



Le paramètre observé, doit nous permettre d'observer le niveau d'humidité du sol à différentes profondeurs pour chaque modalité, au vue des résultats, il est probable que la restriction en eau de - 30% par rapport à l'ETP, appliquée pour la modalité stressée ne soit pas satisfaisante.

La partie physiologie

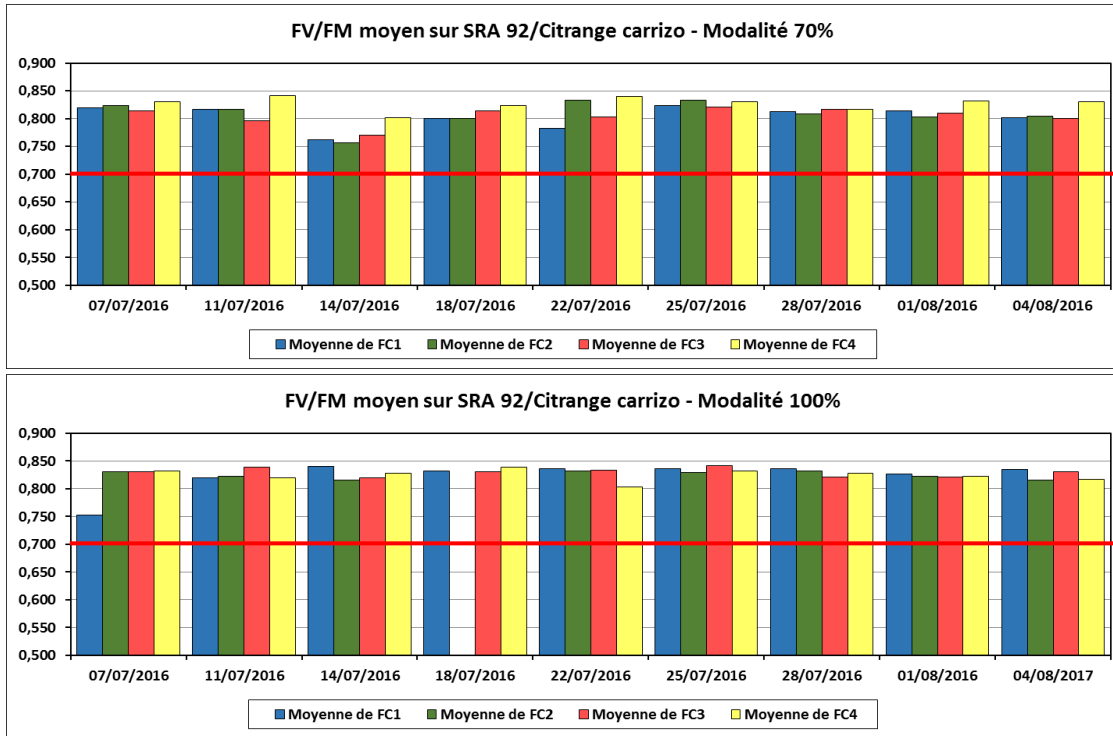
La fuite d'électrolytes : Résultats du taux moyen par modalité et par combinaison :



Le taux moyen de fuite d'électrolyte (voir graphiques ci-dessus), comme pour le paramètre observé précédemment, quelle que soit la modalité ou la combinaison, ne nous permet de mettre en évidence l'impact de la polyploïdie du porte-greffe sur la tolérance au stress hydrique. Le taux moyen se situe entre 10 et 15%.

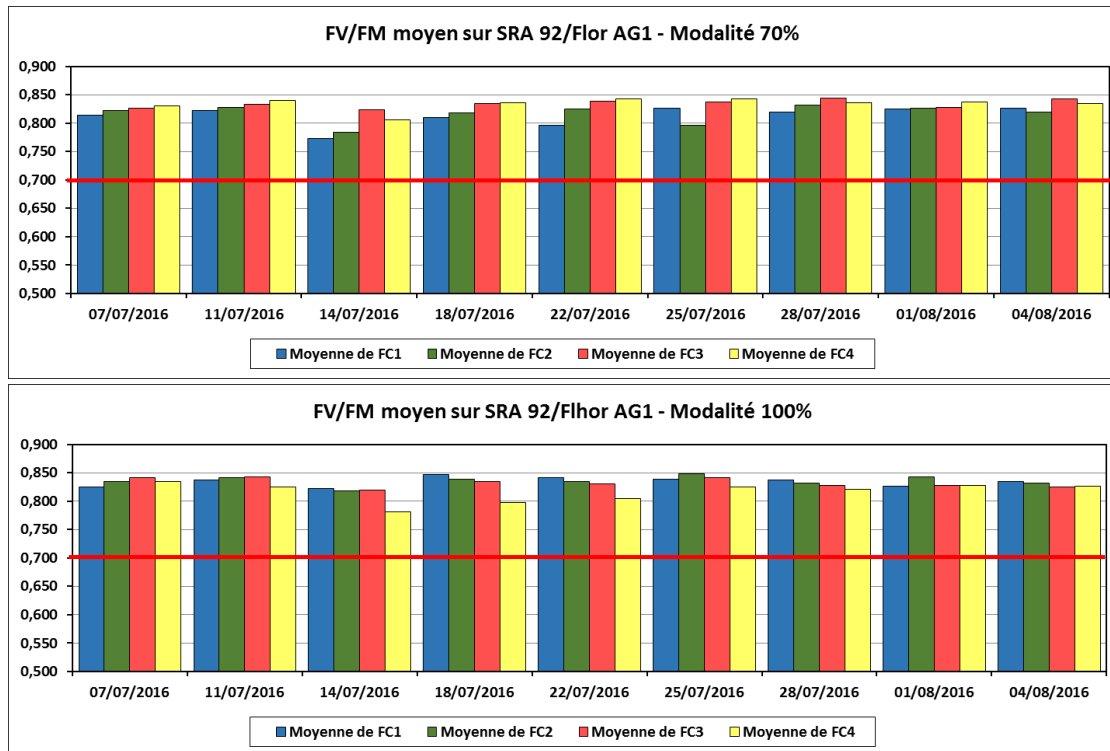
La fluorescence chlorophyllienne : Résultats du rapport FV/FM sur les différentes combinaisons :

Citrange carizzo sur SRA92



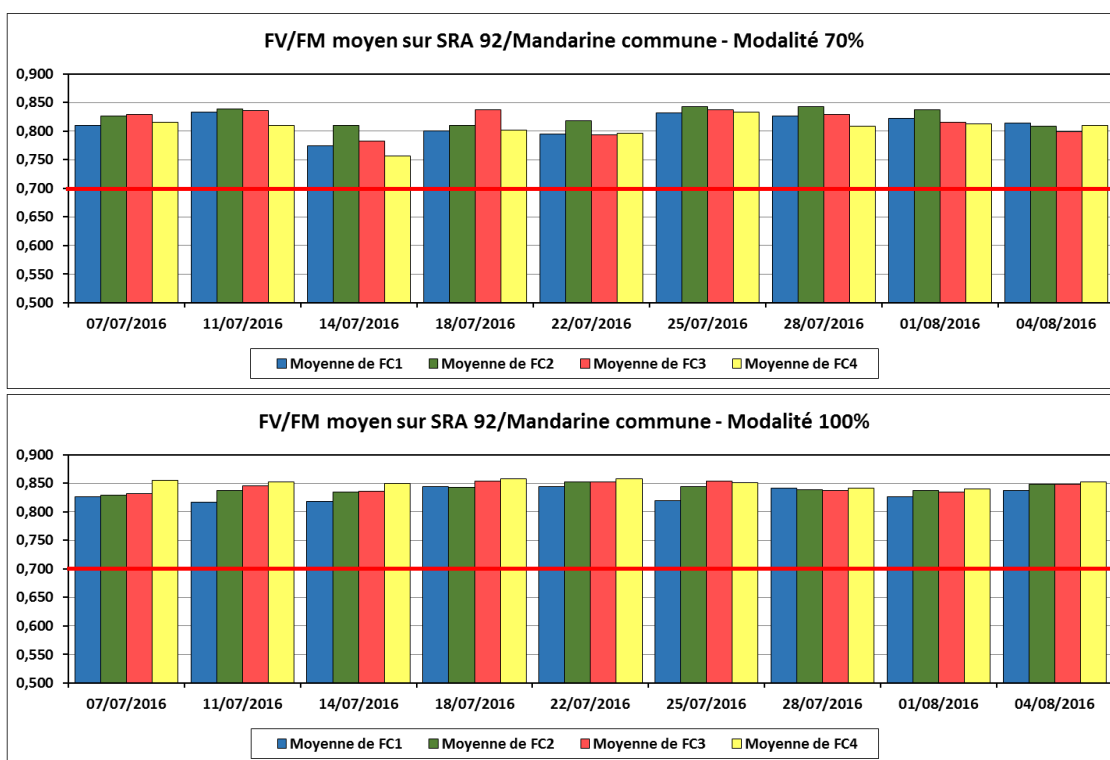
Comme on peut le voir sur les graphiques ci-dessus, le rapport moyen de FV/Fm pour la combinaison **Citrange carizzo/SRA 92**, n'est jamais descendu en-dessous du seuil de 0,7, (indicateur de stress), même si le taux moyen par date est un peu plus faible sur la modalité 70%, il n'y pas de différence très marquée avec la modalité 100%. On observe aussi une légère variation en fonction de la feuille observée.

FhlorAG1 sur SRA92



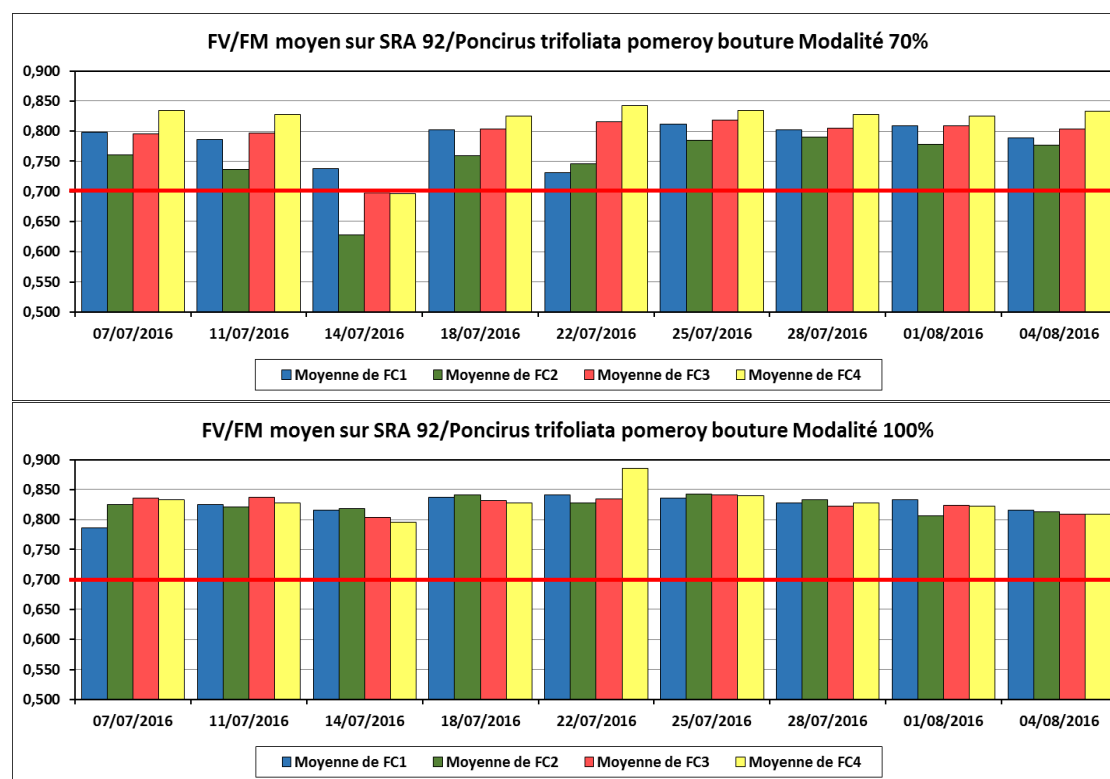
Pour le porte-greffe tétraploïde le **FLHOR AG1**, comme pour les combinaisons précédentes, quelle que soit la date observée, le taux moyen du rapport FV/Fm est toujours supérieur à 0.70, il se situe entre 0.8 et 0.85 pour les deux modalités, avec une variabilité assez marquée pour une même date.

Mandarine commune sur SRA 92



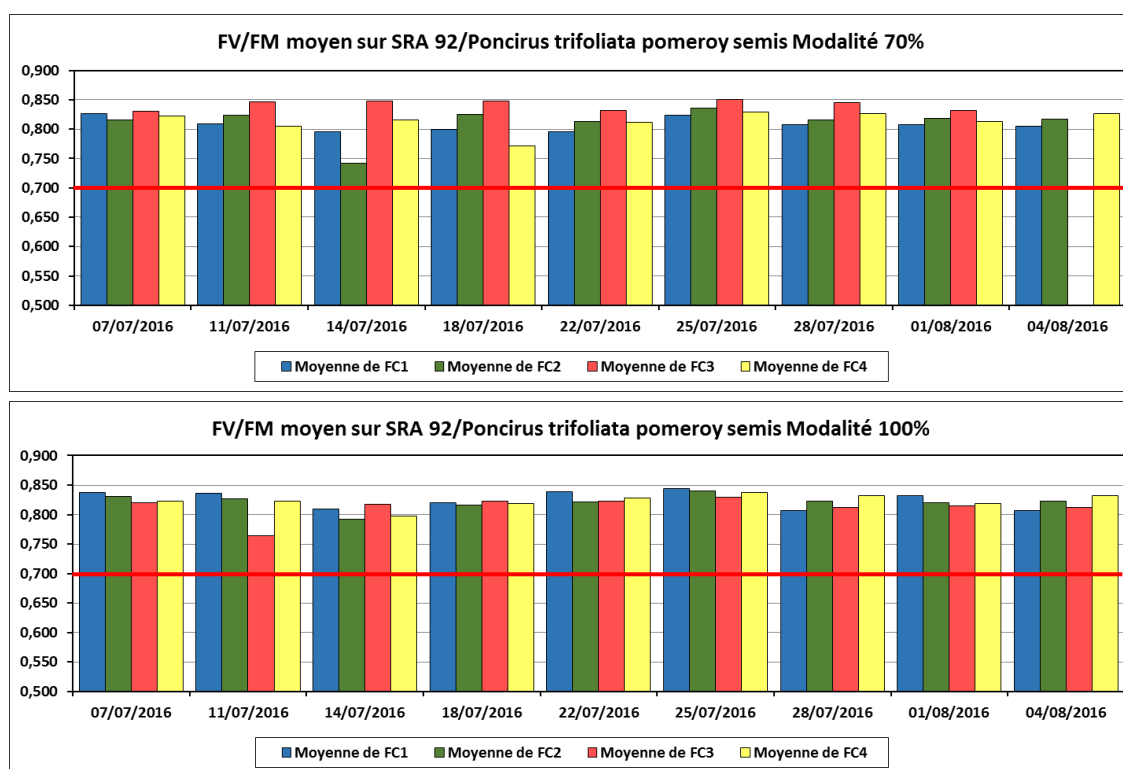
Sur la combinaison **Mandarine commune/SRA 92**, le taux moyen est toujours supérieur à 0.7, il se situe entre 0.8 et 0.85 pour la modalité 100%, il est un peu plus faible et plus irrégulier sur la modalité 70%. On notera aussi qu'il y a une légère variation entre les feuilles mais aussi en fonction des dates.

Poncirus trifoliata bouture :



Pour le porte-greffe **Poncirus trifoliata pomey bouture**, si sur la modalité 100% les données sont relativement homogènes, elles se situent toujours au-dessus du seuil de 0.70. Pour la modalité irrigation 70% les données sont très hétérogènes, il y a une variation assez marquée par date, mais aussi entre les feuilles pour une même date d'observation.

Poncirus trifoliata pomeroiy de semis :



Pour les combinaisons sur *Poncirus pomeroiy de semis*, le taux moyen de FV/FM quelle que soit la modalité et la date d'observation est irrégulier et est toujours au-dessus du seuil. Il y a une variabilité inter-feuilles assez marquée sur la modalité 70% comparée à la modalité 100%.

Résumé :

Quelle que soit la modalité ou la combinaison observée, le rapport moyen FV/FM n'est jamais descendu en-dessous du seuil critique, qui indique que les arbres sont en situation de stress.

Tous les porte-greffes, bien que n'étant pas en situation de stress hydrique, réagissent quelque peu différemment. On note une variabilité inter-feuille plus ou moins marquée, pour une même date d'observation.

Les observations réalisées cette année sur le paramètre (FV/FM), même s'il y a des différences, ne nous permettent pas de mettre en évidence une meilleure tolérance à la restriction en eau du porte-greffe tétraploïde (4x), comparé au diploïdes (2x).

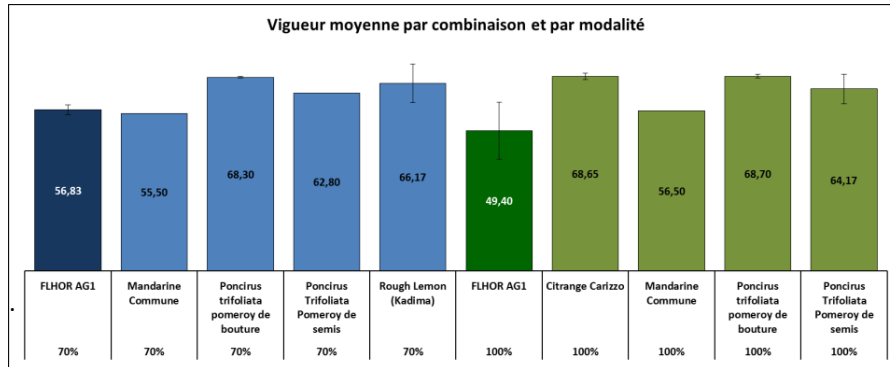
Les taux moyens de fuite d'électrolyte sont très faibles, ils varient peu d'une modalité à l'autre. Ils oscillent en moyenne entre 8 et 12 %.

En conclusion, les résultats des mesures effectuées sur la fluorescence chlorophyllienne et sur le taux moyen de fuite d'électrolyte, ne donnent pas de résultats probants concernant l'effet stress. Dans ces conditions l'effet ploïdie n'est pas avéré. Il est probable que sur la modalité irrigation à 70% de l'ETP, la restriction d'eau appliquée ne soit pas suffisante, pour qu'elle impacte sur la polyplôïdie du porte-greffe. Cela nous incite à revoir pour l'année prochaine le protocole de l'essai concernant le niveau de restriction d'eau à apporter sur la modalité stressée.

La partie agronomie

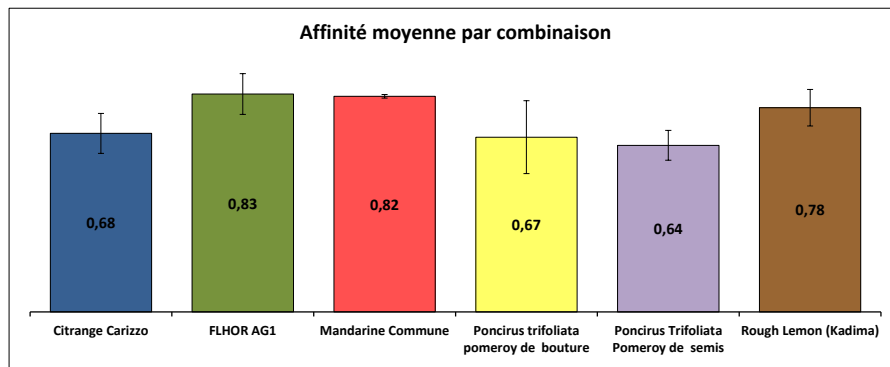
La vigueur, l'affinité porte-greffes/variété, l'intensité de la floraison et évaluation de la charge des arbres :

La vigueur moyenne porte-greffes/variété par combinaison et par modalité :



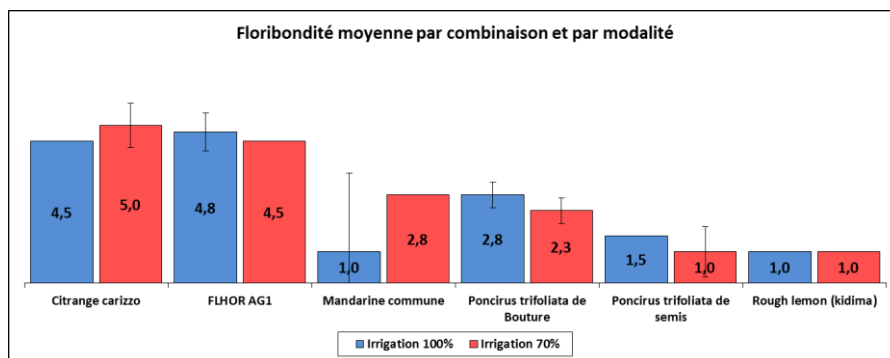
On notera que le porte-greffe tétraploïde (4x) Le *FLHOR AG1* et la mandarine commune sont moins vigoureux que les porte-greffes *Poncirus trifoliata pomey*, *Citrange carizzo* et *Rough lemon*.

L'affinité moyenne porte-greffe/greffon par combinaison et par modalité :



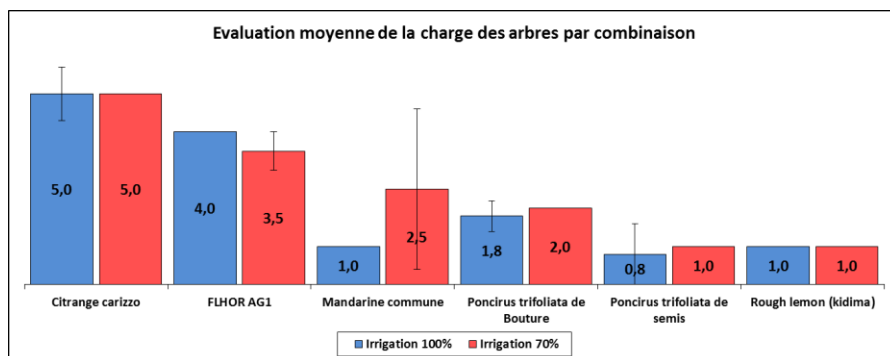
Très bonne affinité du porte-greffe *FLHOR AG1*, *Mandarine commune* et *Rough lemon*, pour les porte-greffes *Citrange carizzo* et les *Poncirus* semis ou bouture elle est légèrement inférieure.

Intensité de floraison et charge moyenne par combinaison :



Bonne intensité de floraison sur *Citrange carizzo* et *FLHOR AG1*, qu'elle que soit la combinaison et pour les modalités 100 % et 70 % irrigation, pour les autres porte-greffes, elle est moyenne à faible. Pas d'effet stress avéré.

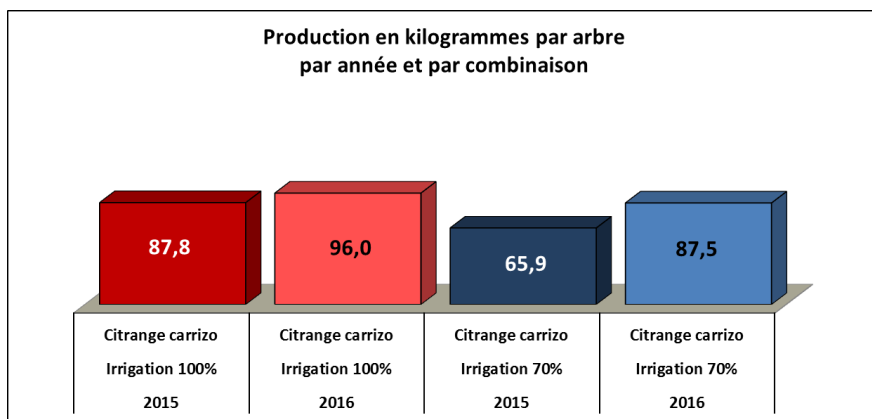
Charge moyenne des arbres :



Pour l'évaluation de la charge des arbres effectuée trois semaines avant les récoltes, elle est conforme aux observations de la floraison, avec une très bonne production sur les combinaisons et les modalités sur *Citrange carizzo* et *FLHOR AG1*.

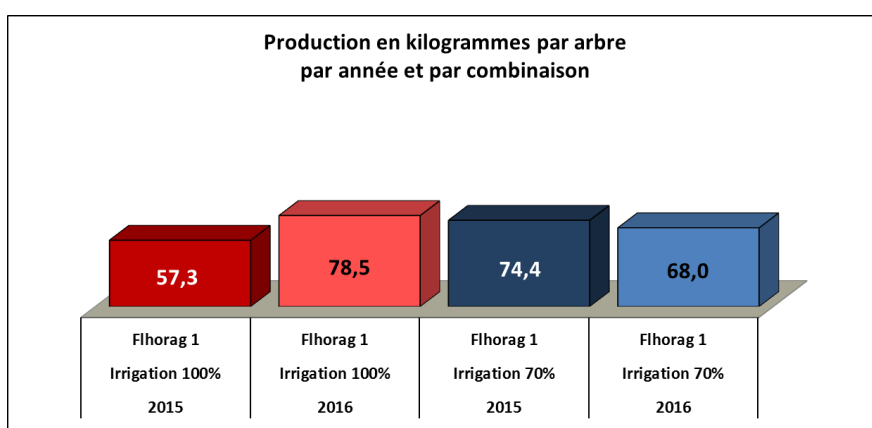
Les rendements moyens par modalité et par combinaison :

Citrange carizzo :



La production de la variété SRA 92 greffée sur *Citrange carizzo* est relativement régulière d'une année sur l'autre. Cette année les rendements sont bons, sur la modalité 70% la charge est moindre comparée à la modalité 100%, mais on ne peut l'attribuer au stress hydrique.

Le FLHOR AG1 :

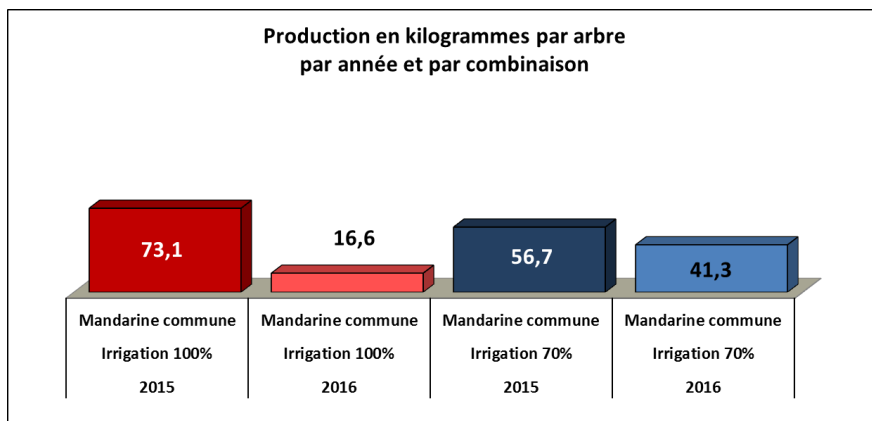


Cette année le rendement sur le porte-greffe tétraploïde (4x) est satisfaisant. Ce porte-greffe a une production relativement régulière d'une année sur l'autre.

La modalité stressée a une production moyenne moins élevée que la modalité non stressée. Cependant comme pour le porte-greffe *Citrange carizzo* cette différence de production est difficilement imputable au seul fait

que cette modalité ait été moins irriguée.

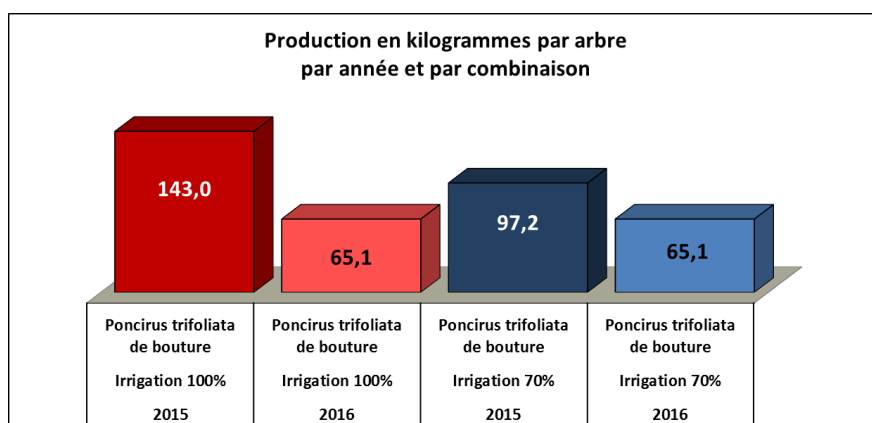
Mandarine commune :



La production est irrégulière, d'une année sur l'autre, tendance à l'alternance.

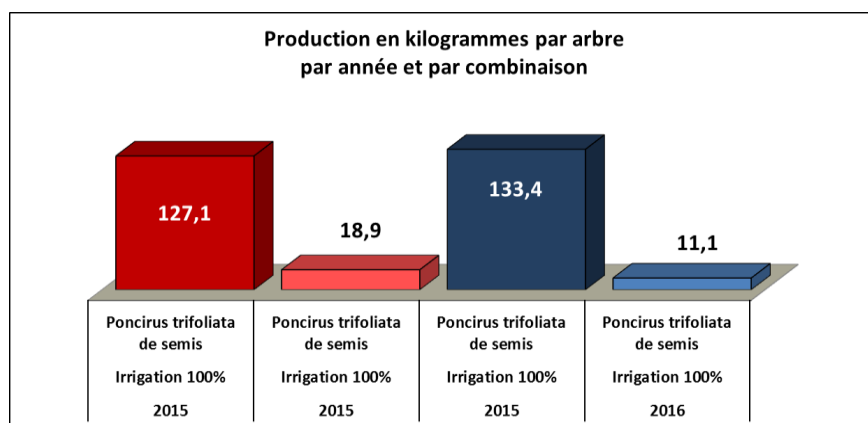
Même si la production est plus importante cette année sur la modalité 70% irrigation, cela ne veut pas dire pour autant qu'il a une meilleure tolérance au stress hydrique.

Poncirus trifoliata de bouture :



Alternance marquée à très marquée au niveau de la production cette année sur cette combinaison.

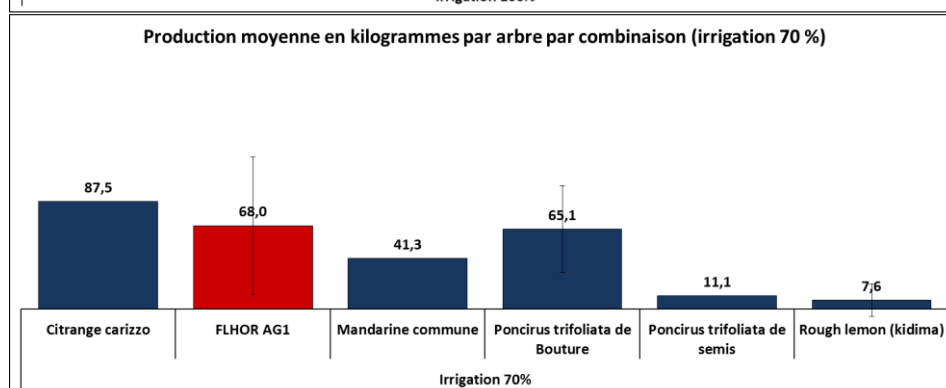
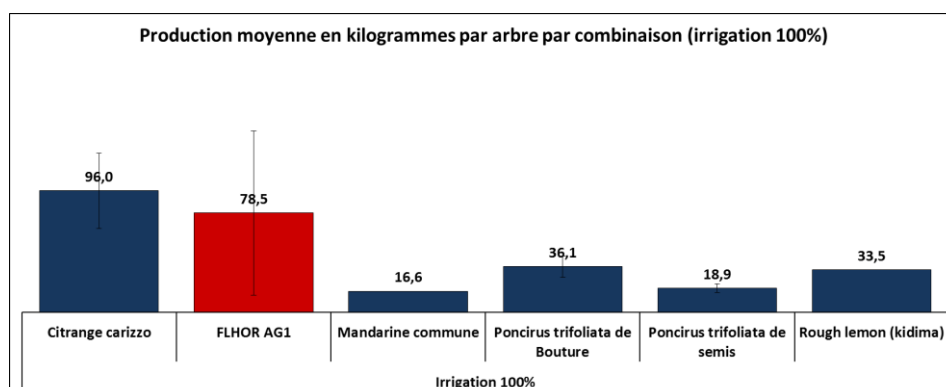
Poncirus trifoliata de semis :



Alternance très marquée sur cette combinaison.

Très forte production en 2015 sur les deux modalités et rendements quasiment nuls cette année.

Les rendements moyens par modalité et par combinaison :



Les rendements quelle que soit la modalité observée sont satisfaisants, pour le *Citrange carizzo* et pour le *FLHOR AG1*.

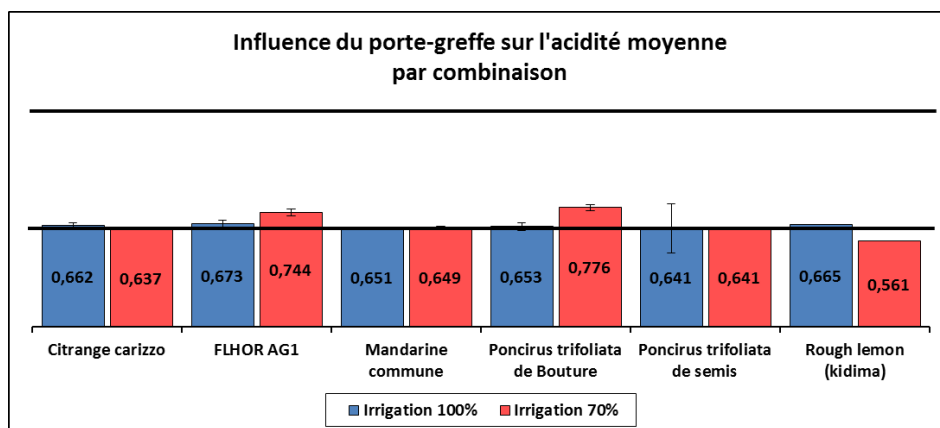
La modalité stressée est un peu moins productive que celle non stressée (voir graph de gauche), cependant il est difficile de l'imputer au stress hydrique.

Pour toutes les autres combinaisons du dispositif, la production est plutôt moyenne à faible, on peut voir sur les graphiques ci-contre que sur le porte-greffe *Poncirus trifoliata de bouture*, la modalité 70% d'irrigation, a une production supérieure à la

modalité non stressée. Les rendements sont très faibles sur *Poncirus pomeroi trifoliata* de semis.

Analyses de l'acidité, du taux de jus et du taux de matière sèche soluble en degrés Brix.

L'acidité :

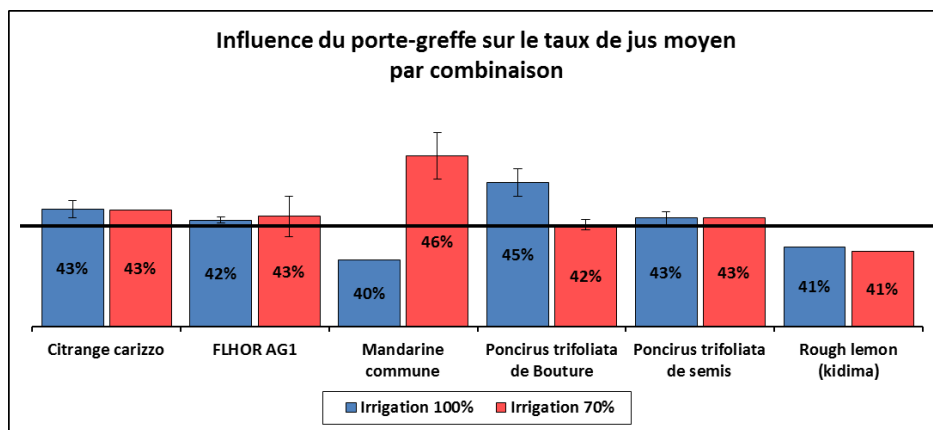


Le taux d'acidité moyen quelle que soit la modalité est très faible, il se situe dans la limite basse imposée par la norme IGP clémentine de Corse.

La différence est très peu marquée entre les différentes modalités, sauf sur les porte-greffes *Flhor Ag 1* et *poncirus trifoliata de bouture* sur la modalité 70%

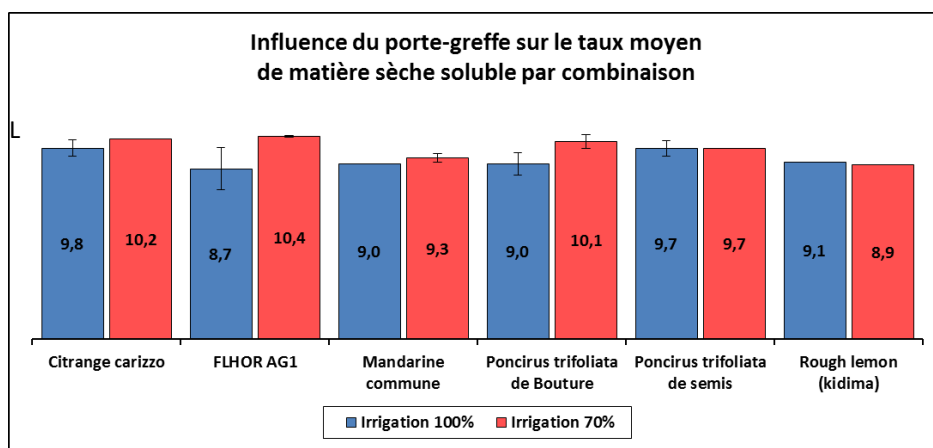
ou le taux moyen d'acidité est légèrement supérieur à la limite basse de la norme IGP.

Le taux de jus :



Mis à part la combinaison *Rough lemon (kidima)* et *Mandarine commune* pour la modalité 100% irrigation, le taux de jus moyen des fruits est toujours au-dessus du seuil fixé par la norme IGP clémentine de Corse.

Le taux matière sèche soluble en degrés Brix :



Globalement le taux de sucre est toujours plus élevé sur la modalité 70 % d'irrigation.

Résumé : On notera le bon comportement, au niveau de la production des porte-greffes *Citrange carizzo* diploïde (2x) et du *FLHOR AG1* tétraploïde (4x).

Pour ces deux combinaisons, les rendements sont moindres pour les modalités 70 % irrigation. Mais il est cependant difficile, d'affirmer que le mode d'irrigation a impacté le nombre de fruits produits.

Pour les autres combinaisons on notera une alternance plus ou moins marquée en fonction du porte-greffe.

Cette année pour ce qui concerne l'acidité, le taux de jus et le taux moyen de matières sèche soluble en degrés Brix, l'impact de la polyploïdie du porte-greffe sur la tolérance au déficit hydrique n'est pas avéré.

La restriction en eau « de moins 30% de l'ETP sur la modalité stressée » n'est pas suffisante pour mettre en évidence un effet stress, il faudra donc pour l'année prochaine stresser les arbres de manière plus conséquente.