

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

Action 1 – Suivi des populations de *Ceratitis capitata* sur la commune de Vescovato en prévision d'un projet de déploiement de la Technique de l'Insecte Stérile.

I. Introduction

En Corse, la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* est un ravageur important des filières arboricoles. En raison des conditions climatiques de l'île favorables pour le développement de ces ravageurs, les impacts économiques générés par cette dernière sont très importants. Ils concernent essentiellement les cultures d'agrumes (clémentine, orange, pomelo) et de fruits d'été (abricot, nectarine, pêche). En effet, les femelles vont pondre des œufs sous l'épiderme des fruits. Les larves vont se développer à l'intérieur des fruits, provoquant des nécroses, rendant ces derniers impropres à la commercialisation et en engendrant leur chute prématurée.

La technique de l'insecte stérile (TIS) est une méthode alternative aux produits phytopharmaceutiques de synthèse qui consiste en l'introduction de très grandes quantités de mâles stériles qui vont entrer en compétition avec les mâles sauvages. Une fois accouplées, les femelles vont pondre des œufs stériles qui ne se développeront pas et ne provoqueront pas de dégâts. Au fur et à mesure que la méthode est déployée les populations de ravageurs vont mécaniquement décliner engendrant une diminution des dégâts. Le projet CeraTIS financé par Ecophyto a pour objectif de déployer cette méthode à l'échelle du bassin de Vescovato pour évaluer la possibilité de déploiement de la TIS à l'échelle de la plaine orientale voire de l'île. Des lâchers de mâles stériles seront donc réalisés en 2021 et 2022 sur une zone test et l'évolution des populations de ravageurs et de l'utilisation de produits phytosanitaires sera comparée à celle d'une zone témoin sans lâchers. En 2019 et 2020, l'objectif de l'AREFLEC est de construire une base de données sur le contexte agricole et écologique local afin d'optimiser les stratégies de lâchers des 2 années suivantes. Ainsi, nous souhaitons faire une évaluation de la dynamique des populations locales des Cératites sur la zone test et une évaluation de l'utilisation des produits phytosanitaires ciblés contre la Cératites.

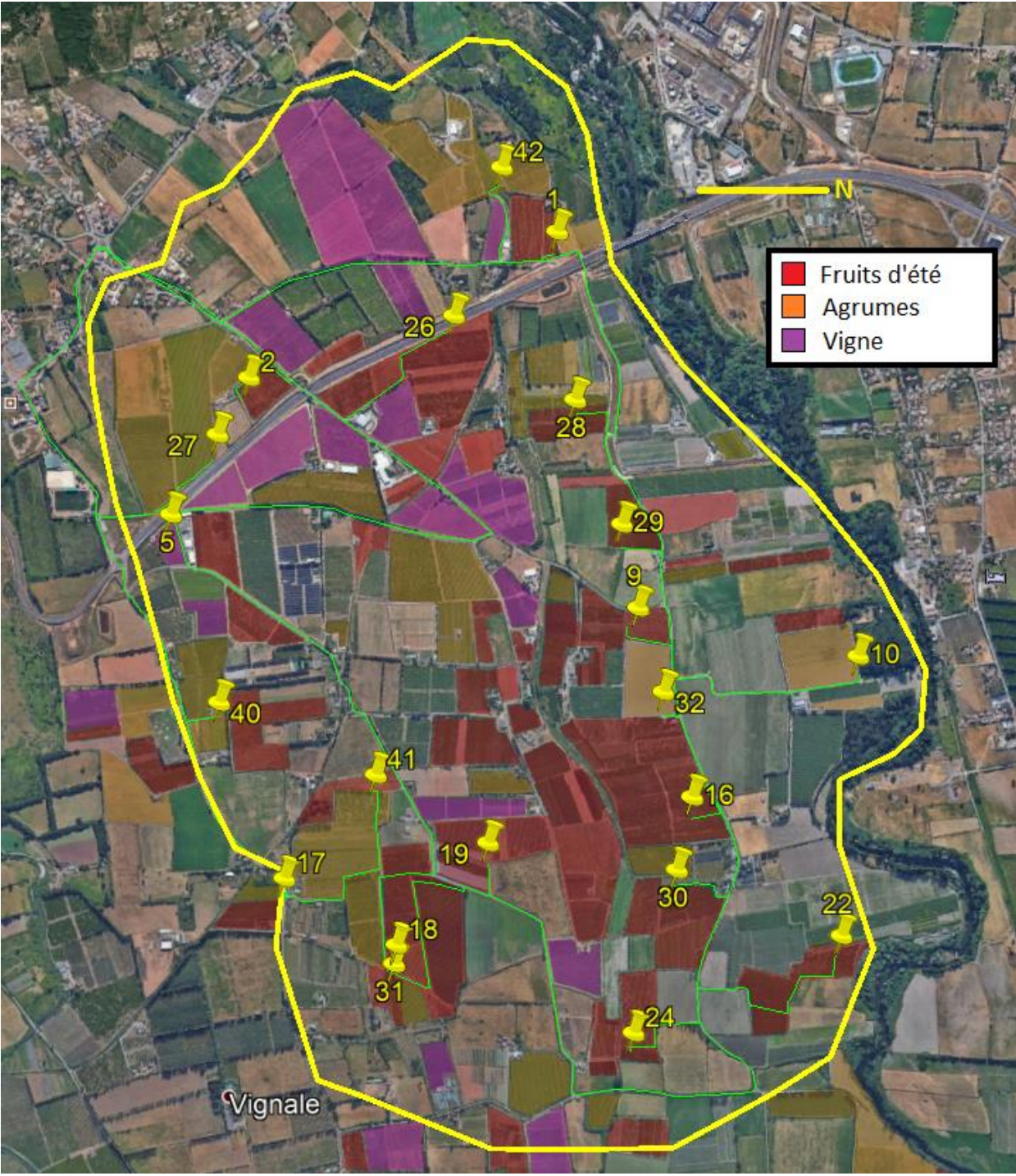
II. Matériel et méthodes

Un réseau de piégeage a été installé sur la zone et un comptage hebdomadaire (mâles + femelles) a été réalisé. Vingt et un pièges SEDQ (cônes avec un attractif alimentaire et couvercle imprégné de deltaméthrine) (photo 1) ont été installés dans des cultures d'agrumes (8), de fruits d'été (12) et de vigne (1) situées dans la zone test. Notre hypothèse est que les pics de populations de *C. capitata* dans ces cultures sont concomitants avec la période de maturité (et donc de sensibilité) des fruits.

Piège SEDQ utilisé en 2019 pour le suivi des populations de *C. capitata*.



Cartographie



III. Résultats

Les résultats seront présentés ici de manière à anonymiser au maximum les données en fonction des parcelles observées. Ainsi, aucune information ne sera divulguée quant au niveau d'infestation ou la quantité et le positionnement des traitements phytosanitaires pour chaque parcelle.

❖ *Dynamique des populations de Ceratitis capitata*

Les relevés ont eu lieu dès le 30 Avril 2019. Jusqu'au 3 Juillet aucune mouche n'a été capturée dans la quasi-totalité des pièges (quelques exceptions avec 1 mouche comptée/semaine). A partir du 3 Juillet la distribution des populations détectées par piège est restée relativement homogène (entre 0 et 620 mouches/semaines) pour 20 pièges alors qu'un piège a montré des niveaux de population très élevé (Figure 1).

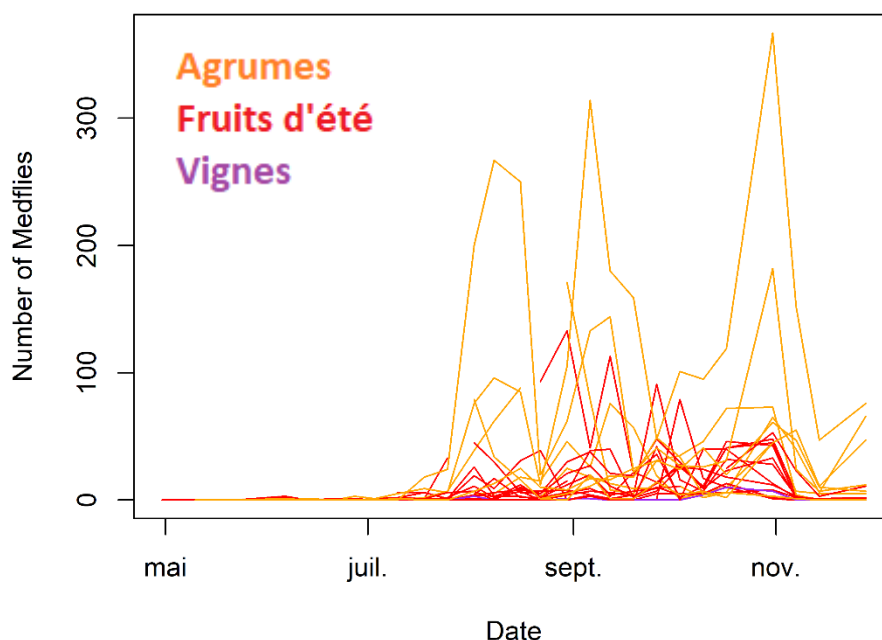


Figure 1 : Evolution du nombre de mouches piégées dans chaque piège depuis le 30 avril

De manière générale et quelque-soit la période de relevé, le nombre de mouches capturées est plus important dans les cultures d'Agrumes que dans les cultures de fruits d'été (le piège présentant des valeurs extrêmes il a été retiré des figures suivantes concernant les effectifs capturés).

Nous avons pu observer des populations présentes en permanence dans les cultures de fruits d'été et d'Agrumes. Quatre « pics » ont été observés à partir du mois d'Aout (Figure 2). Le niveau des populations était néanmoins bien inférieur à celui observé dans les Agrumes où nous avons observé 3 pics important de populations entre Aout et Novembre.

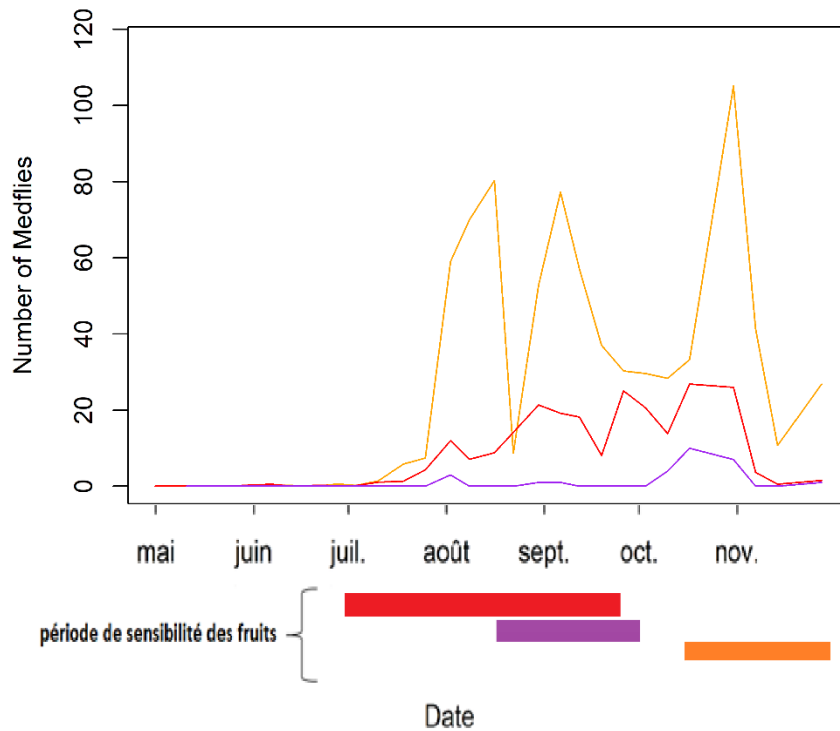


Figure 2 : Nombre moyen de mouches capturées par semaine pour chaque type de culture observé.

Concernant la sex-ratio, compte-tenu le nombre réduit de pièges et de leur plus forte propension à attirer les femelles, il est difficile de faire une interprétation précise des variations de la proportion de mâles observées pendant les suivis (Figure 3).

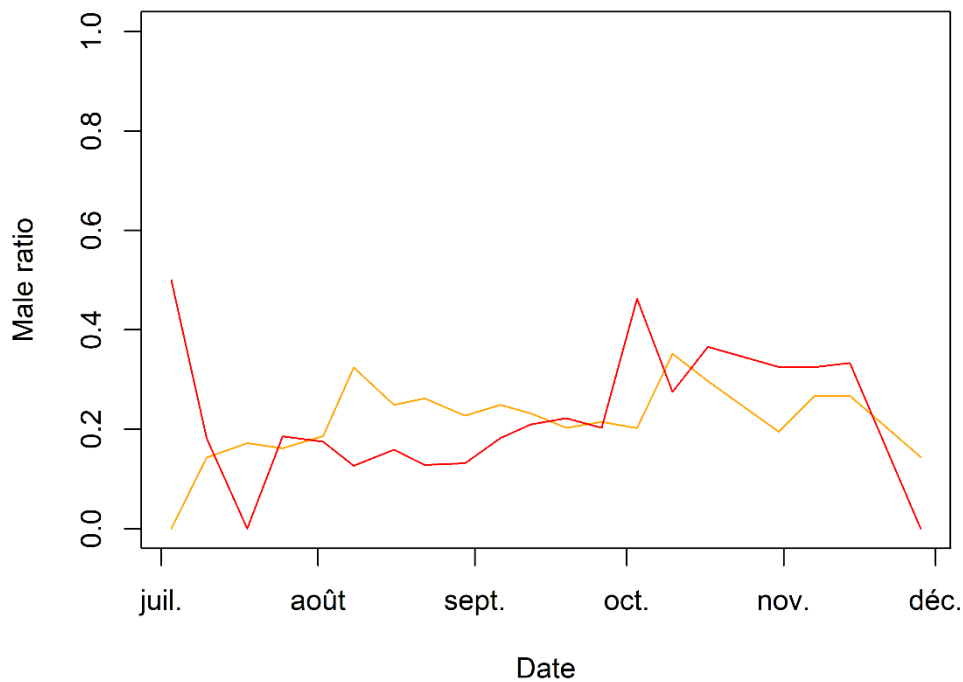


Figure 3 : Evolution de la proportion de mâles capturés chaque semaine en fonction du type de culture observé.

❖ *Suivi des applications de produits phytosanitaires et autres méthodes de lutte*

- Liste des méthodes de protections employées

- ✓ Produits phytosanitaires utilisés selon les déclarations des producteurs ayant des parcelles suivies

Imidan → Celui utilisé le plus couramment. Autorisé sur Agrumes, cerisier et pêchers (<https://ephy.anses.fr/ppp/imidan-50-wg>)

Karaté Zéon → Autorisé contre les mouches sur Cerisier et pêchers, et contre les cicadelles sur Agrumes. (<https://ephy.anses.fr/ppp/karate-technologie-zeon>)

Decis protect --> Autorisé contre la mouche dans les cerisiers. Autorisé également sur Pêche pour un autre usage. (<https://ephy.anses.fr/ppp/decis-protect>)

- ✓ Attract-n-kill / Piégeage massif

Viotrap -- > Autorisé contre les mouches sur Pêchers, Cerisiers et Vignes (<https://ephy.anses.fr/ppp/vio-trap>)

Decis-trap --> Autorisé sur Agrumes, Pêches et Vignes (<https://ephy.anses.fr/ppp/decis-trap>). Dispositif de biocontrôle autorisé en AB sur Agrumes, Pêche et Vignes.

- Impact des traitements sur les populations de mouches

Naturellement, les producteurs ont tendance à installer les méthodes passives (piégeage) en début de saison. Mécaniquement, on observe un déclenchement de traitement dès qu'une augmentation des populations de Cératites est observée. Ci-dessous, l'évolution des captures de Cératites dans 2 pièges (un situé dans une parcelle d'agrumes, l'autre dans une parcelle de fruits d'été) représentatifs de l'ensemble des observations et les positionnements de méthodes de lutte.

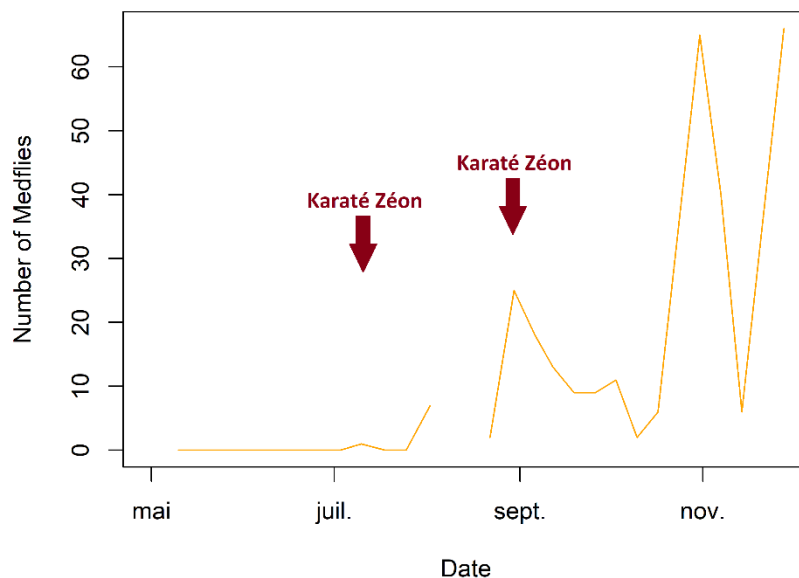


Figure 4 : Evolution des captures dans un piège situé dans une parcelle d'agrumes et positionnements des applications de produits phytosanitaires.

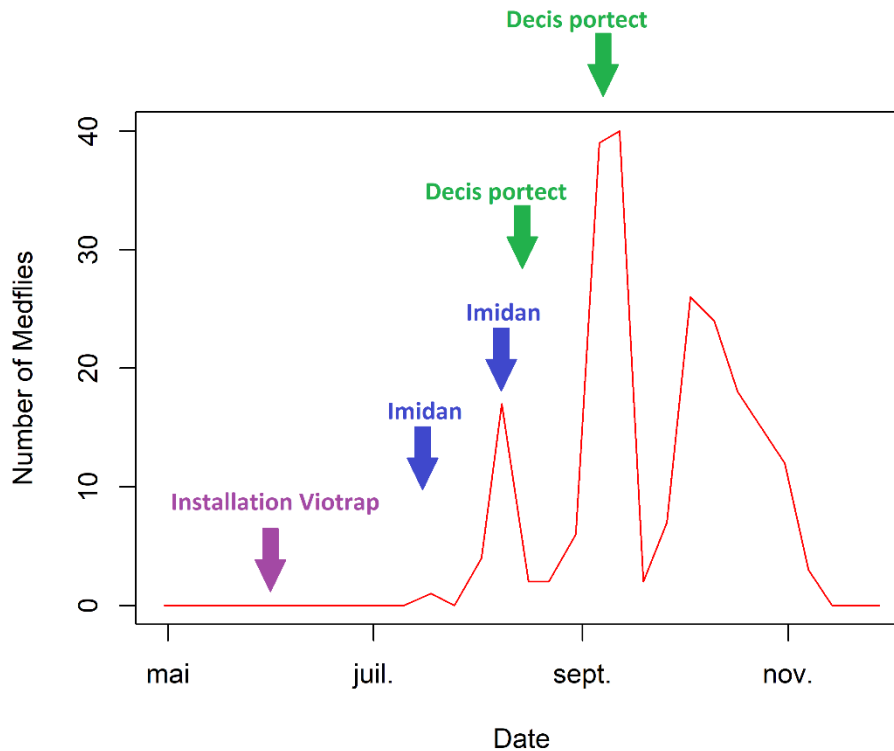


Figure 5 : Evolution des captures dans un piège situé dans une parcelle de fruits d'été et positionnements des applications de méthodes de lutte.

IV. Conclusions

La présence de *Ceratitis capitata* en 2019 a semblé concomitante avec la maturité et la sensibilité des fruits dans les parcelles de fruits d'été. Néanmoins et de manière surprenante, énormément d'individus ont été capturés dans les parcelles d'agrumes à des périodes où les fruits ne sont pas sensibles à la Cératite. Il est possible que ces captures aient eu lieu juste après l'émergence des individus hivernant, en dormance dans le sol dans les parcelles d'agrumes. En outre, peu de traitements phytosanitaires ont eu lieu dans les parcelles d'agrumes en été, contrairement à ce qui peut être observé dans les parcelles de fruits d'été. Ceci peut donc expliquer ces résultats. De manière intéressante, on observe que certains traitements en début de saison sont déclenchés pour des augmentations de populations bien moins marquées que ce qui peut être observé plus tard dans la saison. Compte-tenu de la limitation du nombre d'applications de produits phytosanitaire, cette première donnée soulève une possible réflexion à avoir sur les positionnements de ces traitements. Par extension, cette réflexion va porter sur les seuils de déclenchement actuellement utilisés par les producteurs. En effet, les seuils de déclenchement ont été décidé sur la base de pièges spécifiques aux mâles de Cératites. Or les pièges actuellement utilisés par les producteurs pour leurs suivis sont moins spécifiques et donc susceptibles d'attirer plus de mouches, provoquant un déclenchement de récolte peut-être plus précocement qu'il ne pourrait l'être.

Il s'agissait ici d'une première année de suivi qui va donc être poursuivi en 2020 dans le cadre du projet CeraTIS Corse financé par Ecophyto. Le réseau de piégeage va être étendu au sein de cette zone test et un second réseau de piégeage va être installé dans la zone témoin. Pour optimiser les données de populations en 2020, des pièges à phéromones spécifique des mâles de Cératite vont également être installés. Ils nous permettront d'avoir des données plus fines sur la sex-ratio des populations locales et permettront aux partenaires du projet de développer des modèles d'optimisation des stratégies de lâchers.

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

I. Introduction

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

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

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

II. Matériel et méthode

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

1. Echantillonnage

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

2. Vérification du niveau de ploïdie

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

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

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

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

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

4. Sélection des marqueurs

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

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

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

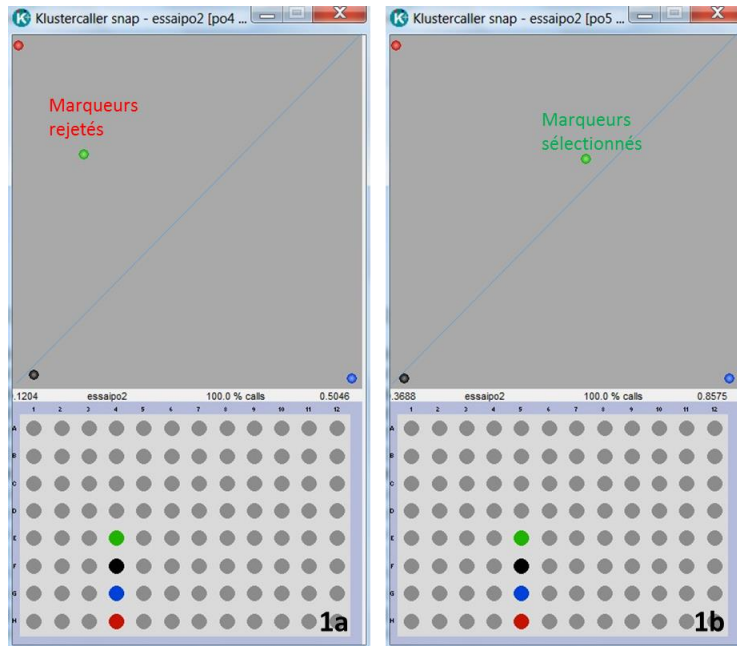


Figure 1 : Illustration de la méthode utilisées pour le premier tri des 18 marqueurs avec les trois témoins. (a) Marqueur rejeté, (b) Marqueur sélectionné.

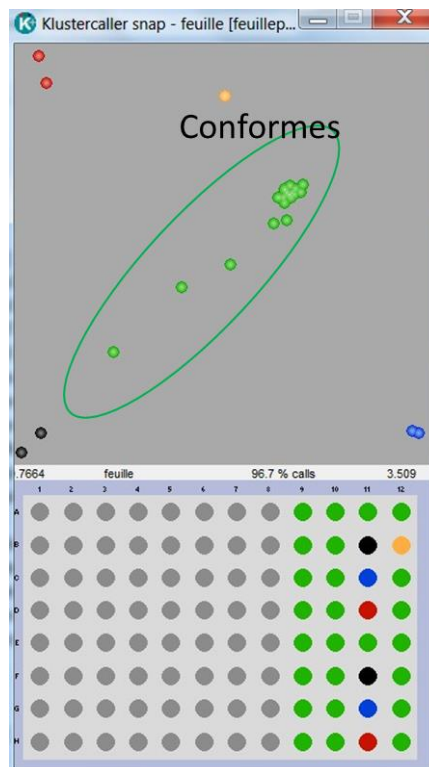


Figure 2 : exemple illustrant le second tri des marqueurs avec 24 échantillons

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

dragon sur lesquels sont récoltés les fruits afin d'en extraire les graines des futurs porte-greffes) et 2 puits d'ADN d'oranger.

III. Résultats

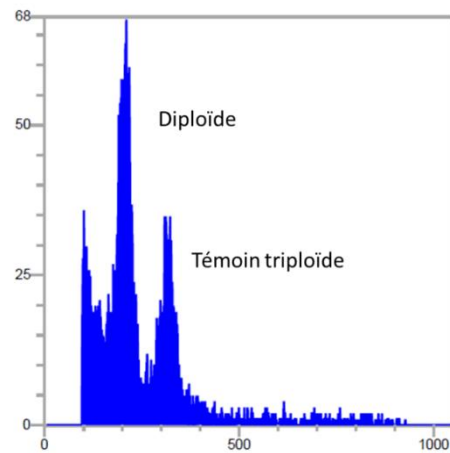
1) Vérification du niveau de ploïdie

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

2) Analyses de conformité

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

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



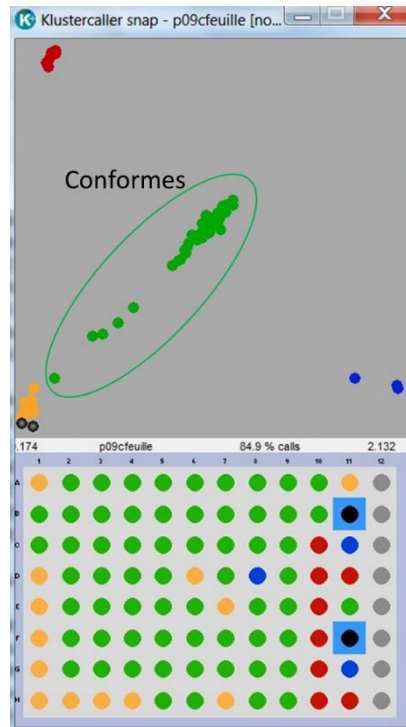


Figure 4 : Illustration de résultat obtenu avec le marqueur po9_7654621C. La colonne 11 est composé des différents témoins les colonnes 1 à 10 sont les échantillons étudié. Les points jaunes représentent les échantillons qui n'ont pas fonctionné. Sur les 80 échantillons on observe 7 non conformes (6 homozygotes pour l'allèle Poncirus –rouge- et 1 homozygote pour l'allèle oranger-bleu)) et 68 conformes (hétérozygotes) pour ce marqueur (vert).

IV. Conclusion

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

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

Les résultats obtenus montrent l'importance du tri morphologique puisque l'on passe de 50% de non conformes sans tri morphologique à 20% de non conformes après tri morphologique. Malgré une nette amélioration du taux de conformité grâce au tri morphologique le pourcentage de non conformes reste malgré tout élevé (de 20 à 30%). Il semble donc important de connaître pour chaque porte-greffe utilisé dans les plantations le pourcentage moyen de non-conformité attendu et de vérifier après le tri morphologique et avant greffage la conformité des porte-greffes et en particulier du C35 qui a un des taux de non-conformité les plus élevés parmi les différents porte-greffes couramment utilisés en Corse. La réalisation d'un listing recensant tous les caractères permettant de réaliser un tri morphologique important au stade pépinière serait très utile. Par ailleurs, suite à l'identification des plants conformes et non conformes dans les différents vergers, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la non-conformité

sur les caractères agronomiques et de qualité de la variété greffée, en particulier dans le contexte de l'IGP.

V. **Références bibliographiques**

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

Annexe I : Protocole extraction ADN

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

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

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

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

Annexe II : Protocole Mix KASPar /échantillon

ADN 2 µL à 2,5ng/µL

Tampon 5 µL

Amorce 0,14 µL

Eau 3 µL

Annexe III : Protocole thermocycleur PCR KASpar

Etape 1 : 94° pendant 15 minutes

Etape 2 : 94° pendant 20 minutes

61° pendant 1 minute

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

Etape 3 : 94° pendant 20 minutes

55° pendant 1 minute

L'étape 3 est répétée 26 fois

Etape 4 : 10°

Annexe IV : Séquences des 8 marqueurs SNP retenus

po1_1262 64T	CAGCGAGTCATGATCTCGCTAAGCACAGGGAGACAGTCATTTGGGATCAC[T/A]GGCCTTACAC CTTTATTACACCACAGCAAATGCTGCCTGCACTGCTGTCAT
po2_3602 2134T	TCCTCCACATCATCATATTTTACTTTTCAGTAGCTTCTGGGATGCTTGCAT[A/G]ACCTTACACCTG AACCAGCAGCCCCGAATGCCACTATCTTGACAGAGGAG
po4_2428 0367T	AAATCAGATGTAAGGGTTGCCGGTTTCAGACATGAAATTGATTTAAACTC[G/A]TGTGTGAGCG AGGATGAAGCTTCATTCACGCCAGCTGCTCCGAGCTCCAA
po5_4134 1368T	GTGAGAAATATAGTTCATGCGAGTACTTCAGATAGGCATTTTTGTGTACA[A/C]GTGATTATGGG TTCGGCTTGCTGTGTTGCTGCAAGGGATGGGACCCTTCC
po3_1517 2063C	GCAGTGGCTGATCTTCAGCCGGTAGATGTGGTTGTATCTCACGTTCTTAA[G/A]CAAATATTGTC TACGGTATGCTGCAATATCTAAGCAGATATCTTCTTTTT
po6_5990 430C	CAGGTACGGCCTAGTGTGTTGCCGGATGATGTGATCGAGCCCCAGTCTGA[G/C]AAATACTGGG AGCCAAACCCACAAACCGGAGTGTGTTGGACCTGCCAGTGG
po8_5419 75T	CCTCCAAAGCCACCAGCTGCCTTTTAAAAGCCAACAGATGGGAAGTAAAA[A/G]TAGCTTCCGA TTTGATCTTTCACTTGTAATAATGTAAGTAAAATTTTTTCC
po9_7654 621C	GCTTTTTTAGGCTGATGTACTCTTAATTAATTGCTTACTCAGGCTGCTC[C/T]AGTCGGTTTAGT GGTTGGGTCTATTGTTTGGACTGAGGATCCGGAGGAGG