



**UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI**  
**ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE**  
**CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE**  
**EN RECHERCHE AGRONOMIQUE**  
**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**AGRONOMIQUE**  
**UMR CNRS 6140 (SPE)**  
**Faculté des Sciences et Techniques**



**Thèse présentée pour l'obtention du grade de**  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CORSE**  
**Mention : Biochimie et Biologie Moléculaire**

**Soutenu publiquement par**

**Sajjad Hussain**

Le 16 février 2011

---

**CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE DE GENOTYPES**  
**D'AGRUME : ETUDES DE TOLERANCE AU STRESS SALIN**  
**ET IMPACTS DE LA PRESENCE DE PORTE-GREFFES**  
**ZYGOTIQUES ET AUTOTETRAPLOÏDES**

---

## **Jury**

### **Rapporteurs :**

M. Manuel Talon, Directeur du Centre de Génomique de l'IVIA, Espagne  
M. Jean-Luc Regnard, Professeur à SupAgro, Montpellier

### **Examineurs :**

Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse  
M. Félix Tomi, Professeur, Université de Corse

### **Directeur :**

M. Raphaël Morillon, Dr-HDR, Chargé de Recherches au CIRAD, IVIA, Espagne

### **Co-directeur :**

M. François Luro, Chargé de Recherches à l'INRA San Giuliano

### **Invité :**

M. Muhammad Akbar Anjum, Professeur à l'Université de Multan, Pakistan

# 1°) RESUME EN LANGUE FRANÇAISE

## « Caractérisation physiologique de génotypes d'agrumes : études de tolérance au stress salin et impacts de la présence de porte-greffes zygotiques et autotétraploïdes »

Les agrumes sont classés parmi les arbres fruitiers les plus sensibles au stress salin. Cependant, une forte diversité existe pour ce caractère au sein des agrumes: *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. est connu pour être très sensible alors que *Citrus reshni* Hort. ex Tan. (Mandarinier Cleopâtre) est l'un des génotypes les plus tolérants. La stratégie habituelle pour améliorer la résistance des porte-greffes est basée sur l'hybridation entre des parents ayant des caractères intéressants complémentaires. Une autre façon d'acquérir une tolérance au stress salin de porte-greffe est liée à la tétraploïdie par le doublement du nombre de chromosomes. L'analyse génétique et physiologique de la tolérance au stress salin de tout nouveau génotype est donc requise pour les programmes de sélection de variétés plus adaptées. Des études combinant des approches génétiques (cartographie du génome) ainsi que des approches physiologiques liées à la diversité du groupe des agrumes ont été réalisées afin d'être en mesure de corrélérer dans le futur les phénotypes de tolérance au stress salin observés avec l'expression des génomes respectifs.

Une population F2 résultant de la pollinisation d'un hybride F1 (*C. reshni* x *P. trifoliata*) a été réalisée. L'étude de la ségrégation de 135 marqueurs microsatellites et de 4 gènes candidats a permis l'établissement de 15 groupes de liaison. La majorité des marqueurs (57%) montrent une ségrégation non mendélienne sans doute due à un dysfonctionnement lors de l'appariement des chromosomes intergénériques lors de la méiose chez le parent hybride. La comparaison de la carte génétique obtenue avec la carte génétique de référence de clémentinier montre que la colinéarité des marqueurs a été respectée. De même, la tolérance au stress salin de vingt-deux génotypes représentant la diversité des agrumes a été étudiée. Les différents génotypes ont ensuite été soumis à un stress salin. Plusieurs paramètres physiologiques tels que le taux de croissance, la teneur en chlorophylle, la teneur totale en composés phénoliques, le rendement du transport d'électrons du PSII, la conductance stomatique ainsi que le taux de photosynthèse ont été mesurés. Différents comportements physiologiques de tolérance au stress salin en fonction des espèces d'agrumes étudiés ont été observés suggérant l'existence de différents mécanismes à l'origine de la tolérance au stress salin. Les cédratiers se sont révélés être les plus sensibles alors que tous les mandariniers et pamplemoussiers étaient tolérants. De nombreux génotypes ont présentés des symptômes de chlorose, des accumulations d'ions chlorure et sodium dans les feuilles et des changements des paramètres physiologiques. Les profils spécifiques de tolérance étaient quant à eux associés à un maintien de la photosynthèse même si de plus faibles valeurs de conductance stomatique ont pu être observées. Dans le même temps, la croissance des plantes était maintenue avec de faibles accumulations en ions chlorure et sodium. Certaines espèces comme les pomelos ont montré à la fin de l'essai une chute des feuilles suivie par une nouvelle pousse que nous avons interprétée comme une réponse d'adaptation.

Des travaux réalisés par le CIRAD montrent que des porte-greffes tétraploïdes permettent d'augmenter les propriétés de tolérance aux stress salin et hydrique chez les agrumes. Il était donc utile de caractériser l'impacte de la présence de porte-greffes zygotiques ou tétraploïdes sur les rendements et la qualité des fruits du scion, en relation avec la physiologie des arbres. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que les porte-greffes zygotiques n'affectent pas les rendements moyens pour un génotype donné. Au contraire, les porte-greffes tétraploïdes diminuent de façon très importante les productions sans toutefois changer la qualité des fruits.

La physiologie du clémentinier greffé sur deux porte-greffes diploïdes et de leurs tétraploïdes respectifs a également été analysée et suggère que la moindre croissance des associations porte-greffe tétraploïde/clémentinier est due à une photosynthèse plus limitée. Toutefois, le flux de transport d'électrons en condition de lumière saturante s'est révélé être supérieur dans les feuilles de clémentinier greffé sur porte-greffes tétraploïdes suggérant que ces mêmes porte-greffes conféreraient une meilleure capacité adaptative de la photosynthèse aux conditions environnementales.

**Mots-clés:** Agrume, diversité, stress salin, tétraploïde.

## 2°) Abstract in English

« Physiological characterization of citrus genotypes: salt stress tolerance studies and impact of the presence of zygotic and autotetraploid rootstocks »

*Citrus* are classified among the most sensitive tree crops to salt stress. However, strong diversity exists for this trait in the citrus gene pool e.g. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. is highly susceptible while *Citrus reshni* Hort. ex Tan. (Cleopatra mandarin) is one of the most tolerant genotype. Usual strategy to improve the resistance of rootstocks is based on hybridization between parent sharing complementary interesting characters. One other way to gain a salt stress tolerance for rootstocks is related to tetraploidy by chromosome doubling. Therefore genetic and physiological analysis for salt stress tolerance of any genotype is required for breeding programs and selection of more adapted varieties. We initiated studies combining genetic approaches (genome mapping) as well as physiological approaches related to the diversity of the citrus group in order to be able to correlate the specific phenotypical traits of tolerance for different citrus genotypes with their genome expression in the future. A F2 population resulting from self pollination of hybrid F1 (*C. reshni* x *P. trifoliata*) was created, and the segregation of 135 SSR markers plus 4 candidate genes was studied allowing establishing of 15 linkage groups. A majority of the markers (57%) showing skewed segregation probably due to the intergenomic chromosome pairing during meiosis of the hybrid parent. Furthermore, markers colinearity was respected by comparing this map to the reference clementine genetic map.

In the meantime, we tested salt stress tolerance of twenty two citrus genotypes representing the citrus diversity among the more usual scions and rootstocks. The different genotypes were then subjected to salt stress. Physiological parameters such as growth rate, chlorophyll content, total phenolic compounds content, quantum yield of PSII electron transport, stomatal conductance as well as photosynthesis rate were monitored along the stress. Different physiological behaviors for salt stress tolerance depending of the citrus species were observed suggesting existence of different mechanisms for salt stress tolerance. Citrons were the most sensitive while all mandarins and pummelo were tolerant. All genotypes affected by salt stress were characterized by chlorosis symptom induction, chloride and sodium accumulation in leaves and by the change of physiological parameters. Specific profile of tolerance was associated with photosynthesis maintaining even though lower values of stomatal conductance were observed. In the mean time, plant growth was maintained with chloride and sodium accumulations. Some species such as grapefruits showed at the end of the assay an extended leaf drop completed by a growth of new leaf that we interpreted as a response of adaptation.

Work conducted by CIRAD showed that use of tetraploid rootstocks lead to increase salt stress and water deficit tolerance properties in citrus. Therefore, it was interesting to characterize the impact of the presence of zygotic or tetraploid rootstocks on yields and fruit quality parameters related to the tree physiology. Results we obtained suggest that the presence of zygotic rootstocks did not affect the average yields of fruit for any given genotype. On the contrary, tetraploid rootstocks decreases dramatically fruit production without changing the quality of fruit when compared to the use of diploid rootstocks. The physiology of the tree of two rootstocks at the diploid and tetraploid level was also analyzed. Results suggest that the reduced growth of tetraploid rootstock / clementine associations was due to a more limited photosynthesis. However, the maximum electron flow rate under saturated light was found to be higher in leaves of clementine grafted on tetraploid rootstock suggesting that tetraploid rootstocks confer a greater adaptive capacity of photosynthesis to environmental conditions.

---

Key words: Citrus diversity, salt stress, tetraploid.