

Sommaire

AVANT-PROPOS	
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
I. Sécheresse, irrigation et salinisation des sols	1
1.Problématique du manque d'eau dans les régions sèches	1
2.La pratique de l'irrigation et ses conséquences sur la qualité des sols	2
3.La salinisation des sols et la sensibilité des espèces cultivées	5
II. Les agrumes	8
1.Origine et taxonomie des agrumes	8
2.La diversité des agrumes et ses limites d'exploitation	8
3.La diversité des agrumes et la variabilité des résistances aux facteurs biotiques et abiotiques.....	9
4.Le greffage des agrumes : moyen d'adaptation aux facteurs environnementaux	10
5.Accumulation des ions Na^+ et Cl^- chez les agrumes greffés : exemples d'association porte-greffe / greffon	12
6.Création de nouveaux porte-greffe cumulant des tolérances aux facteurs biotiques et abiotiques.....	13
6.1. Création par hybridation sexuée	13
6.2. Création par hybridation somatique.....	13

III. Déroulement de la réponse au stress salin (NaCl) chez les plantes	14
IV. Déterminants physiologiques de la tolérance au stress salin chez les plantes : état de connaissances chez les agrumes	17
1.La	croissance 17
2.La	régulation stomatique et des échanges gazeux 18
3.La	photosynthèse 19
V. Déterminants moléculaires de la tolérance au stress salin chez les plantes : état de connaissance chez les agrumes.....	19
1.La	perception du stress salin 20
2.La	transduction du signal du stress salin 21
2.1. Les cations Ca^{2+}	21
2.2. L'hormone ABA (Acide ABscissique)	21
2.3. Les Espèces actives de l'oxygène 'ROS'	23
3.Les	cascades de signalisation 24
3.1. La voie Salt Overly Sensitive 'SOS'	24
3.2. La voie Mitogen-Activated Protein Kinase 'MAPK'	25
3.3. Les phosphatases.....	26
4.Les	facteurs de transcription 27

4.1.	Les protéines à doigt de zinc.....	27
4.2.	Les protéines à doigt de zinc de type WRKY	27
4.3.	Les protéines Myb.....	28
5.	Activation de l'expression de gènes pour l'adaptation au stress salin	29
5.1.	Osmoprotection.....	29
5.1.1.	La glycine-bétaïne	29
5.1.2.	La proline.....	31
5.2.	Les protéines chaperonnes : Late Embryogenesis Abundant 'LEA'	33
5.3.	La régulation de l'homéostasie ionique	34
5.3.1.	Transport de Na^+	35
5.3.2.	Transport de Cl^-	36
5.4.	L'homéostasie hydrique : les aquaporines	37
5.5.	La détoxification antioxydante	39
5.5.1.	L'acide ascorbique et l'Ascorbate peroxydase	40
5.5.2.	Le glutathion et la glutathion réductase (GR).....	41
5.5.3.	La superoxyde dismutase (SOD).....	42
5.5.4.	La catalase (CAT).....	43
VI.	La polyploïdie et son impact chez les plantes.....	44
1.	La polyploïdie	44
2.	La polyploïdie chez les plantes	44
3.	Impacts de la polyploïdie chez les plantes	45

3.1. Impact phénotypique.....	45
3.2. Impact génomique.....	46
4.Impact de la polyploïdie chez les agrumes	47
5.Amélioration de la tolérance des agrumes aux stress via l’hybridation somatique	47
VII. Présentation des travaux de thèse	1
MATERIEL ET METHODES	1
I. Matériel végétal.....	1
II. Conditions de croissance et application du stress salin	1
III. Méthodologie	3
1.Caractérisation génétique des agrumes polyploïdes	3
1.1. Recherche des individus autotétraploïdes : cytométrie en flux	3
1.2. Recherche et élimination des individus zygotiques	3
2.Caractérisation de l’allotétraploïde FLHORAG1	4
2.1. Comptage chromosomique	4
2.2. Héritabilité des génomes nucléaire et cytoplasmiques chez le FLHORAG1	4
2.2.1. Extraction et quantification de l’ADN total	4
2.2.2. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne PCR	5
2.2.3. Electrophorèses sur gel de polyacrylamide dénaturants et non dénaturants.....	5
3.Anatomie foliaire chez les agrumes polyploïdes	6

3.1.	Mesure de la surface stomatique.....	6
3.2.	Mesure de l'épaisseur foliaire.....	7
3.3.	Mesure de la croissance.....	7
3.4.	Dosage du taux de chlorophylle.....	7
4.	Déterminants physiologiques du stress salin chez les agrumes polyploïdes.....	7
4.1.	Mesure de l'efficacité du photosystème II.....	7
4.2.	Dosage minéral : concentrations foliaires et racinaires en Na ⁺ et en Cl ⁻	8
5.	Etude transcriptomique de la réponse au stress salin chez les agrumes polyploïdes.....	9
5.1.	Extraction des ARN totaux.....	9
5.2.	Analyse transcriptomique par la technique de cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	10
5.2.1.	Principe de la technique cDNA-AFLP.....	10
5.2.2.	Technique.....	11
5.2.2.1.	Isolement des ARNm et synthèse des ADNc double brin.....	11
5.2.2.2.	La réaction AFLP.....	11
5.2.2.3.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant.....	13
5.2.2.4.	Isolement et séquençage des TDFs (Transcript Derived Fragments).....	13
5.2.2.5.	Analyse fonctionnelle des TDFs.....	14
5.3.	Analyse transcriptomique par PCR quantitative : RT-PCR en temps réel.....	14
5.3.1.	Principe.....	14
5.3.2.	Technique.....	16
	RESULTATS.....	18
I.	Résultats sous forme d'articles.....	18

1.Article	1
.....	18
2.Article	2
.....	50
II. Résultats complémentaires.....	87
Etude de la tolérance au stress salin chez deux variétés d'agrumes greffés sur les Poncirus diploïdes et autotétraploïdes et sur l'hybride FLHORAG1.....	87
1.Etude des déterminants physiologiques de la tolérance à la salinité chez différentes associations porte-greffe / greffon.....	87
1.1. Epaisseur des feuilles et contenu en eau	87
1.2. Fluorescence chlorophyllienne de feuilles, $[(F_m - F_0)/F_m]$	88
1.3. Contenus racinaires et foliaires en ions chlorures.....	89
2.Etude des déterminants moléculaires de la tolérance au stress salin chez les différentes associations porte-greffe / greffon.....	92
DISCUSSION GENERALE	97
I. Effet de l'auto- et l'allopolyploïdisation chez les porte-greffe d'agrumes en condition de non stress	97
II. Effet de l'auto- et l'allopolyploïdisation chez les porte-greffe d'agrumes en condition de stress salin	98
1.Le porte-greffe Poncirus trifoliata	98
2.La variété mandarinier commun	100
3.Le FLHORAG1	101

III. Réponse des variétés greffés sur les porte-greffe autotétraploïdes de Poncirus et sur l'allotétraploïde FLHORAG1	102
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	106
ANNEXES	140

Liste des abréviations

ABA: Acide abscissique

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire

APX: Ascorbate peroxydase

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

BADH : Bétaïne aldéhyde déshydrogénase

BET: Bromure d'éthidium

CAT: Catalase

AFLP: Amplified fragment length polymorphism

CIRAD: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le développement

cGMP: 3', 5'- guanosine monophosphate cyclique

CMO : Choline monooxygénase

CNCG: Cyclic nucleotide-gated channel

COD: Choline oxydase

Ct: Cycle threshold

CTAB: bromure d'hexadécyltriméthylammonium

CP: Crossing point

DAPI: 4', 6-diamino-2-phenylindole

DEPC: Diéthylpyrocarbonate

dNTP: désoxynucléotides triphosphates

ECe : conductivité électrique

EDTA: acide éthylène-diamine-tétraacétique

EST: Expressed sequence tag

FAO: Food and alimentation organization

GSH: Glutamyl cysteinyl glycine

GR: Glutathione reductase

GTP: 3'-guanosine triphosphate

HKT: High affinity K^+ transporter

ICP-MS: Inductively coupled plasma-mass spectrometer

LEA: Late embryogenesis abundant

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MAPKK: Mitogen-activated protein kinase kinase

MAPKKK: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase

MIP: Membrane intrinsic protein

MOPS: Acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique

NCBI: National center of biotechnology information

NCED: 9-epoxycarotenoid-dioxygenase

NHX: Na^+/H^+ exchanger

NIP: Nodulin26-like intrinsic protein

NSCC: Nonselective cation channel

OEHC: Office de l'Équipement Hydraulique de Corse

pb: paire de bases

PCR: Polymerized chain reaction

PIP: Plasma-membrane intrinsic protein

PSII: Photosystème II

PVP: Polyvinyl pyrrolidone

P5CS: Delta1-pyrroline-5-carboxylate-synthase

P5CR: Delta1-pyrroline-5-carboxylate-réductase

Q_A: Quinone A

Q_B: Quinone B

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

ROS: Reactive oxygen species

RT-PCR: Retrotranscription-Polymerized chain reaction

SDS: Dodecyl sulfate de sodium

SIP : Small intrinsic protein

SOS: Salt overly sensitive

SOD: Superoxyde dismutase

SSR: Single sequence repeats

SV-NSCC: Slow vacuolar-Nonselective cation channel

TAE: Tris-acétate-EDTA

TBE: Tris-borate-EDTA

TDF: Transcript derived fragment

TEMED: N, N, N', N'-TetraMethylene-Diamine

UV: Ultraviolet

VI-NSCC: Voltage independent-Nonselective cation channel

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. CLASSEMENT DES ESPECES CULTIVEES SELON LEUR SENSIBILITE A LA SALINITE.	6
TABLEAU 2. EXEMPLES D'ESPECES CULTIVEES CLASSEES SELON LEUR SENSIBILITE A LA SALINITE.	7
TABLEAU 3. LISTE DES GENOTYPES D'AGRUMES ETUDIES LORS DES DEUX EXPERIENCES DE STRESS SALIN	2
TABLEAU 4. LISTE DES AMORCES UTILISEES LORS DE L'AMPLIFICATION SELECTIVE EN CDNA- AFLP.....	13

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. DISTRIBUTIONS MONDIALES DES ZONES SECHES (A) ET DE LA PLUVIOMETRIE (B) (FAO, 2008).	1
FIGURE 2. DISTRIBUTION MONDIALE DES SURFACES CULTIVEES SOUS IRRIGATION (FAO- AQUASTAT 2008).	2
FIGURE 3. DISTRIBUTION MONDIALE DES SOLS SALINISES (FAO, 2008).	3
FIGURE 4. FONCTION GENERALE DE LA REPONSE DU RENDEMENT D'UNE ESPECE CULTIVEE A LA SALINITE DU SOL.	5
FIGURE 5. SCHEMA GENERAL DU DEROULEMENT DE LA REPONSE AUX STRESS HYDRIQUE ET SALIN CHEZ LES PLANTES (D'APRES WANG ET AL., (2003A) ET XIONG ET AL., 2002).	15
FIGURE 6. IMPLICATION DES CANAUX NON SELECTIFS DE CATIONS (NSCC) DANS LA PERCEPTION ET LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DU STRESS SALIN.	20
FIGURE 7. VOIE ET REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE L'ABA.	22
FIGURE 8. REGULATION DE L'HOMÉOSTASIE DES IONS Na^+ PAR LA VOIE SOS DURANT LE STRESS SALIN.	25
FIGURE 9. VOIES DE BIOSYNTHESE DE LA GLYCINE-BÉTAÏNE EN CONDITIONS STRESSANTE (A) ET NORMALE (B).	30
FIGURE 10. MÉTABOLISME DE LA PROLINE CHEZ LES PLANTES.	32
FIGURE 11. REGULATION DE L'HOMÉOSTASIE CELLULAIRE DU Na^+ EN SITUATION DE STRESS SALIN CHEZ <i>A. THALIANA</i> D'APRES YOKOI ET AL. (2002)	36
FIGURE 12. CYCLE ASCORBATE-GLUTATHION D'ASADA-HALLIWELL : LA VOIE DE PIÉGEAGE DU H_2O_2 ET DE RÉGÉNÉRATION DE L'ASCORBATE.	40
FIGURE 13. LES DIFFÉRENTS PRODUITS DE L'HYBRIDATION SOMATIQUE.	48
FIGURE 14. MODÈLE GRAPHIQUE DE LA PCR EN TEMPS REEL (FLUORESCENCE EN FONCTION DU NOMBRE DE CYCLES PCR).	15
FIGURE 15. A. CONTENU FOLIAIRE EN EAU MESURÉE AU 49 ^{EME} JOUR DU STRESS SALIN POUR LES VARIÉTÉS GREFFÉES CEDRATIER ET CLEMENTINIER SRA92. B. ÉPAISSEUR FOLIAIRE (EN MM) DES VARIÉTÉS GREFFÉES EN FONCTION DU PORTE-GREFFE UTILISÉ EN CONDITION TÉMOIN.	88
FIGURE 16. $[(F_M - F_0)/F_M]$ MESURÉE DURANT LE STRESS SALIN CHEZ LES DEUX VARIÉTÉS GREFFÉES SUR PONCIRUS DIPLOIDES ET AUTOTETRAPLOÏDES ET FLHORAG1.	89
FIGURE 17. CONTENU EN IONS CHLORURE DANS LES RACINES DES PORTE-GREFFE, PONCIRUS DIPLOÏDE ET AUTOTETRAPLOÏDE ET FLHORAG1, EN ASSOCIATION AVEC LE CEDRATIER ET LE CLEMENTINIER SRA92 AU 49 ^{EME} JOUR DE STRESS.	90

FIGURE 18. EVOLUTION DE L'ACCUMULATION FOLIAIRE DES IONS CHLORURES CHEZ LES DEUX VARIETES GREFFEES SUR LES PORTE-GREFFE DIPLOÏDES ET AUTOTETRAPLOÏDES DE PONCIRUS ET SUR LE FLHORAG1 AU COURS DU STRESS SALIN.	91
FIGURE 19. NIVEAU DE TRANSCRITS FOLIAIRES DU GENE CODANT POUR LA PROTEINE SENSEUR DE Ca^{2+} (SOS3) AU 49 ^{EME} JOUR DE STRESS CHEZ LES PORTE-GREFFE FRANCS DE PIED ET CHEZ LES VARIETES GREFFEES SUR PONCIRUS DIPLOÏDES ET AUTOTETRAPLOÏDES ET FLHORAG1.....	92
FIGURE 20. NIVEAU DE TRANSCRITS FOLIAIRES DU GENE CODANT POUR L'ENZYME NCED1 AU 49 ^{EME} JOUR DE STRESS CHEZ LES PORTE-GREFFE FRANCS DE PIED ET CHEZ LES VARIETES GREFFEES SUR PONCIRUS DIPLOÏDES ET AUTOTETRAPLOÏDES ET FLHORAG1.....	93
FIGURE 21. NIVEAUX DE TRANSCRITS FOLIAIRES DES GENES CODANT POUR LES ENZYMES CMO (A) ET P5CS (B) AU 49 ^{EME} JOUR DE STRESS CHEZ LES PORTE-GREFFE FRANCS DE PIED ET CHEZ LES VARIETES GREFFEES SUR PONCIRUS DIPLOÏDES ET AUTOTETRAPLOÏDES ET FLHORAG1.....	94
FIGURE 22. NIVEAU DE TRANSCRITS FOLIAIRES DU GENE CODANT POUR LA PROTEINE CHAPERONNE cLEA5 AU 49 ^{EME} JOUR DE STRESS CHEZ LES PORTE-GREFFE FRANCS DE PIED ET CHEZ LES VARIETES GREFFEES SUR LES PONCIRUS DIPLOÏDES ET AUTOTETRAPLOÏDES ET FLHORAG1.....	95
FIGURE 23. NIVEAU DE TRANSCRITS FOLIAIRE DU GENE CODANT POUR LE TRANSPORTEUR DE Cl^- (CCC12Ac) AU 49 ^{EME} JOUR DE STRESS CHEZ LES PORTE-GREFFE FRANCS DE PIED ET CHEZ LES VARIETES GREFFEES SUR PONCIRUS DIPLOÏDES ET AUTOTETRAPLOÏDES ET FLHORAG1.	96

AVANT-PROPOS

Dans les régions sèches (semi-arides, arides et désertiques) où la fréquence des précipitations est très irrégulière et où l'évaporation des eaux de surface est très importante, les systèmes d'irrigation ont été considérablement développés. Ainsi, les superficies des cultures irriguées représentaient 8 millions d'hectares en 1800, 48 millions en 1900 mais s'étendent actuellement sur 300 millions d'hectares. L'extension rapide des terres irriguées a contribué à la sécurité alimentaire (environ 50% des productions de blé et de riz), la réduction de la pauvreté et l'amélioration de la qualité de vie d'une part importante de la population mondiale. Cependant le développement de l'irrigation se heurte à une multitude de menaces dont la pénurie croissante en eau de surface de qualité, l'évolution de la salinisation et la réduction de la fertilité des terres. Dans le but de faire face au problème de salinisation des terres, plusieurs solutions sont avancées pour le développement des cultures : le dessalement des eaux d'irrigation et des sols salinisés, l'utilisation des pratiques culturales appropriées et la sélection d'espèces et de variétés adaptées à la salinité.

Les espèces cultivées étant majoritairement sensibles à la salinité dans le sol, le besoin de sélectionner des variétés résistantes s'est considérablement intensifié pendant cette dernière décennie. Les agrumes sont classés parmi les espèces les plus sensibles à la salinité. Se développant dans les régions semi-arides et spécialement dans le bassin méditerranéen, les agrumes sont confrontés à la contrainte saline qui touche 8 des 25 pays méditerranéens. La sélection et la création de porte-greffe d'agrumes tolérants au sel et cumulant par ailleurs des résistances à des facteurs biotiques tels que le virus de la tristeza et le *Phytophthora* sont à l'ordre du jour pour assurer la durabilité de l'agrumiculture dans cette zone de production.

L'utilisation des porte-greffe autotétraploïdes pourrait être une voie très prometteuse, les génotypes tétraploïdes étant décrits dans la littérature comme plus tolérants aux stress abiotiques. De même, compte tenu des difficultés rencontrées par l'amélioration conventionnelle, le développement de l'hybridation somatique (fusion de protoplastes) est devenu une voie encore plus prometteuse, permettant d'additionner l'ensemble des génomes nucléaires de porte-greffe présentant des caractéristiques complémentaires pour leur résistance aux contraintes biotiques et abiotiques.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier la réponse au stress salin de porte-greffe diploïdes, autotétraploïdes et d'un allotétraploïde afin de vérifier ou infirmer leur intérêt potentiel pour l'agrumiculture.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Sécheresse, irrigation et salinisation des sols

1. Problématique du manque d'eau dans les régions sèches

Les régions sèches dans le monde sont représentées par les zones arides, semi-arides et désertiques. Ces zones couvrent environ 37% de la surface des continents (Figure 1A). Le climat régnant dans les zones semi-arides se caractérise par des précipitations annuelles comprises entre 300 et 600mm, par des précipitations annuelles comprises entre 100 et 300mm pour les zones arides et enfin par des précipitations annuelles inférieures à 100mm pour les zones désertiques (Figure 1B). Ce type de climat se caractérise par des pluies très irrégulières concentrées en hiver, et des étés longs chauds et secs. Les conditions climatiques associées à la succession des années de sécheresse ont entraîné la raréfaction des ressources en eau dans ces régions.

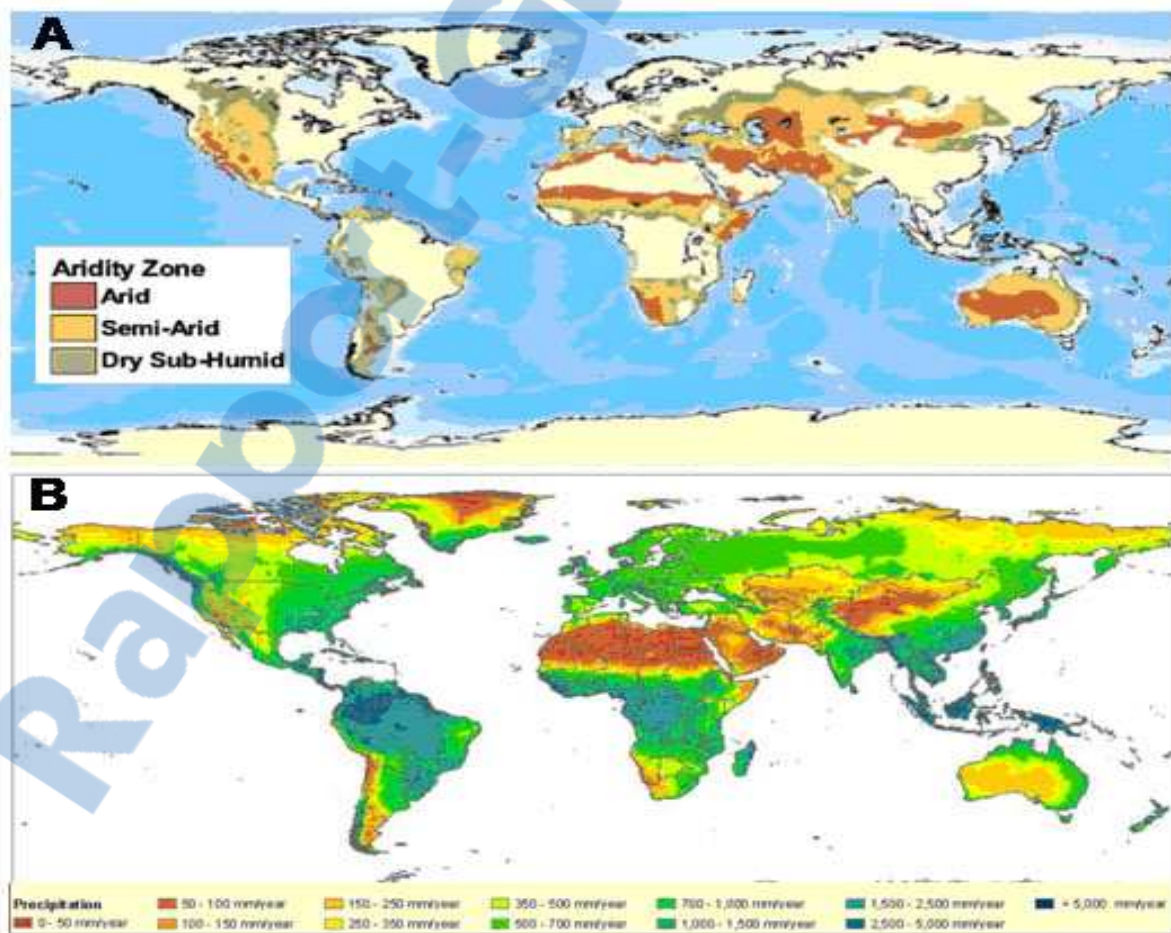


Figure 1. Distributions mondiales des zones sèches (A) et de la pluviométrie (B) (FAO, 2008).

Dans le but de répondre aux demandes croissantes de leurs populations en matière de productions agricoles et alimentaires, les pays situés dans les régions sèches ont étendu leurs superficies cultivées et ont développé considérablement l'irrigation. De façon générale, les nouvelles surfaces cultivées ont été conquises sur les terres en bordure des zones montagneuses et des steppes des régions arides. Associée à l'intensification du surpâturage et à la destruction des espèces ligneuses pour le bois, cette extension a provoqué l'accélération des phénomènes d'érosion hydrique, de salinisation des sols et de désertification (Options méditerranéennes-CIHEAM, 1975).

2. La pratique de l'irrigation et ses conséquences sur la qualité des sols

A l'échelle mondiale, les surfaces cultivées ont été recensées à la fin du 20^{ème} siècle : environ 1.5 à 1.8 milliards d'hectares sont cultivés dont 16 à 18% sont soumis à l'irrigation (FAO 2008) (Figure 2). Aujourd'hui les terres irriguées produisent 40% de l'alimentation mondiale à partir d'environ 17% des surfaces cultivées (FAO, 2001).

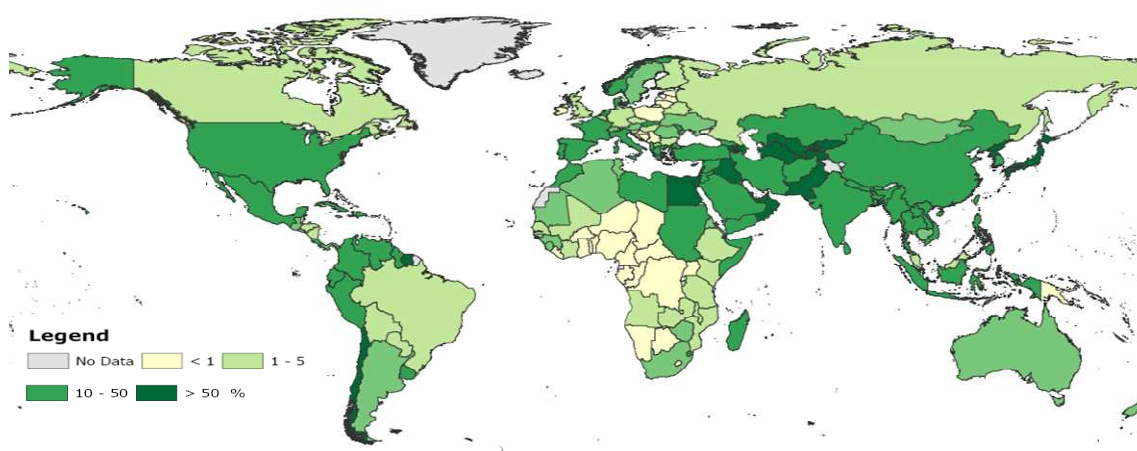


Figure 2. Distribution mondiale des surfaces cultivées sous irrigation (FAO-AQUASTAT 2008).

L'eau utilisée en irrigation peut provenir de cinq origines différentes : l'eau de surface provenant des précipitations, l'eau des nappes phréatiques, l'eau fossile provenant d'aquifères (formations géologiques contenant de façon temporaire ou permanente de l'eau mobilisable), les eaux usées traitées et l'eau de mer désalinisée. Dans les zones sèches, l'irrigation à partir des eaux de surface est limitée naturellement par la forte variabilité des précipitations annuelles, elle est surtout réalisée avec des eaux souterraines. Toutefois dans beaucoup de

régions soumises à la sécheresse, l'utilisation des ressources en eau non conventionnelles telles que les eaux usées non traitées (riches en sels neutres, métaux lourds, éléments organiques et organismes pathogènes) et l'eau désalinisée (qui reste en général à haute teneur en sels), reste une pratique très fréquente comme au Koweït (39% des surfaces irriguées), à l'île de Malte (37%), au Bahreïn (14%) et au Maghreb (0.8%) (FAO-AQUASTAT, 2008).

Sur le plan écologique, l'accroissement de la production agricole via la pratique de l'irrigation s'est effectué au détriment des ressources naturelles. Les mauvaises pratiques d'utilisation de l'eau telles que l'irrigation avec des eaux non conventionnelles, associées à un manque en matière de systèmes de drainage a eu des répercussions défavorables sur les propriétés physiques (structure et perméabilité) des sols. Ainsi un apport en eau supérieur à la perte par évapotranspiration entraîne une hydromorphie (saturation en eau) temporaire ou permanente du sol, et l'apport d'une eau chargée en sels entraîne l'accumulation de ces derniers au dessus de la nappe sous forme diffuse (en saison humide) et leur remontée à la surface sous forme de croûte (en saison sèche) (Options méditerranéennes-CIHEAM, 1975).

D'après le service de la gestion des terres et de la nutrition des plantes de la FAO, plus de 6% des terres dans le monde sont affectées par le phénomène de salinisation induit par les mauvaises pratiques culturales (Figure 3). Les sols à haute teneur en sel ont une valeur et une productivité considérablement diminuées causant d'importants dommages socio-économiques et d'irréversibles changements environnementaux. L'accumulation naturelle des sels et l'accélération du phénomène par la mauvaise gestion des terres et des eaux entraînent la perte des surfaces cultivables mettant en péril la sécurité alimentaire mondiale.



Figure 3. Distribution mondiale des sols salinisés (FAO, 2008).

La concentration en sels d'un sol est déterminée par la mesure de sa conductivité électrique (ECe) exprimée en déciSiemens/m (dS/m) ou en ppm (parts per million) ($1\text{dS/m} = 640\text{ ppm} = 640\text{ mg/Kg}$). Un sol est considéré comme salinisé lorsque son ECe est supérieur ou égal à 4 dS/m (2.56 g/Kg).

Les sols peuvent être affectés par deux types de salinisation appelés communément les salinisations primaire et secondaire. La salinisation primaire a lieu naturellement dans les régions où la roche mère du sol est riche en sels solubles tels que les chlorures de sodium (NaCl), de magnésium (MgCl_2), de calcium (CaCl_2), les sulfates et les carbonates. Dans les régions arides et semi-arides où les précipitations sont insuffisantes pour lessiver les sels solubles du sol et où le drainage est restreint, les sols salins se forment par accumulation de hautes concentrations de sels, ces sols sont dits 'salinisés'. Les sels océaniques participent aussi au phénomène de salinisation des sols. Ces sels dits 'cycliques' sont transportés jusqu'aux terres par le vent et y sont ensuite déposés suite aux précipitations. En effet, l'eau de pluie contient de 6 à 50 mg/Kg de NaCl, une concentration qui tend à diminuer en s'éloignant de la zone côtière. Par ailleurs, la salinisation du sol est dite secondaire lorsque des quantités significatives d'eau riche en sels sont apportées par irrigation. En absence de réseaux de drainage adéquats, l'augmentation de la teneur en sels dans les sols irrigués réduit leur productivité en limitant la capacité des cultures à capter l'eau et les micronutriments. Les sols salinisés sont très peu fertiles et la germination et la levée des semences des céréales à titre d'exemple y sont entravées (Kaur and Duffus, (1989) ; Donovan and Day, (1969)).

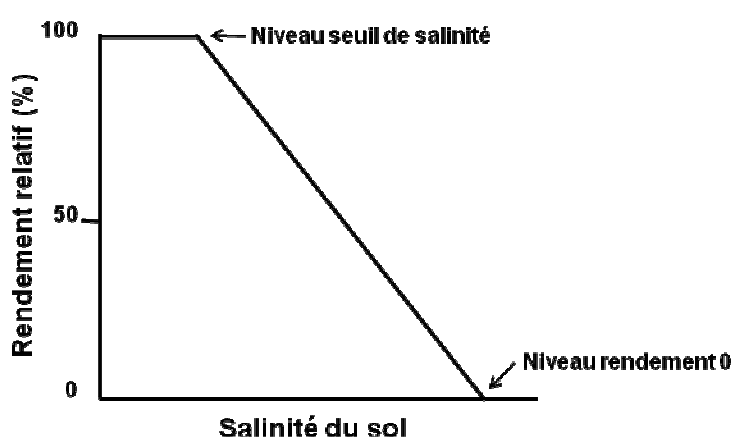
Aujourd'hui 10 à 15% des terres irriguées sont affectées à différents degrés par la salinisation (Figures 2 et 3). Au Pakistan plus de 25% des terres irriguées sont salinisées, en Tunisie (25%), aux Etats Unis (23%), en Inde (17%), en Chine (15%) et en Afrique du Sud (9%) (FAO, 2006).

En conditions salines, la disponibilité de l'eau peut être améliorée de différentes façons; tout d'abord en facilitant le lessivage des sels accumulés au niveau des racines, en améliorant les systèmes de drainage, en utilisant des systèmes d'irrigation adaptés aux plantes cultivées, et enfin en utilisant des variétés plus tolérantes au sel.

3. La salinisation des sols et la sensibilité des espèces cultivées

À très faible concentration, les sels présents à l'état naturel dans le sol sont absorbés comme éléments nutritifs par les végétaux. Cependant, à des concentrations plus élevées, les sels solubles peuvent empêcher les racines d'absorber l'eau et les éléments nutritifs et, ainsi, restreindre la croissance des espèces cultivées, d'où un rendement plus faible. La sensibilité des plantes à la salinité du sol varie de façon continue durant le développement. Le premier effet du stress salin est le retard de la germination et de l'émergence des racines. En effet les espèces cultivées sont majoritairement tolérantes au sel pendant la phase de germination, mais sont plus susceptibles pendant l'émergence du sol et la phase juvénile à cause des hautes concentrations de sel au niveau racinaire. Si la plante survit à ces trois stades elle devient plus tolérante durant les autres stades de développement.

La réponse des espèces cultivées à la salinité peut être quantifiée en traçant la courbe de la réponse de la croissance ou du rendement relatifs en fonction de l'augmentation de la salinité du sol. Maas and Hoffman, (1977) ont proposé que la courbe de réponse du rendement à la salinité est représentée par deux droites, une horizontale représentative de la non réponse à la salinité croissante (à faibles concentrations), et une deuxième droite dépendante de la salinité et dont la pente indique la réduction du rendement par unité d'augmentation de la salinité jusqu'au niveau zéro (à hautes concentrations). Le point d'intersection des deux droites désigne le niveau de salinité seuil équivalent au maximum de salinité du sol tolérable n'affectant pas le rendement de l'espèce cultivée (Figure 4).



(D'après Maas and Hoffman, 1977)

Figure 4. Fonction générale de la réponse du rendement d'une espèce cultivée à la salinité du sol.

En se basant sur les niveaux de seuil de salinité et du rendement zéro, Jensen (1980) a classé les espèces cultivées en 4 groupes : sensible, modérément sensible, modérément tolérante et tolérante (Tableau 1). Dans le tableau 2 sont listés quelques exemples d'espèces cultivées classées selon leur sensibilité à la salinité dans les 4 groupes.

Tableau 1. Classement des espèces cultivées selon leur sensibilité à la salinité.

Classe de sensibilité au sel	Niveau seuil de salinité (mM de NaCl)	Niveau de rendement zéro (mM NaCl)
Sensible	14	80
Modérément sensible	30	160
Modérément tolérante	60	240
Tolérante	100	320

(D'après Jensen, 1980)

Les agrumes sont classés parmi les espèces ligneuses les plus sensibles à la salinité (Tableau 2). Selon Ayers and Westcot, (1985), la conductance électrique minimale tolérable dans le sol est de 1.8 dS/m (18mM de NaCl) pour le pomelo et de 1.7 dS/m (17mM de NaCl) pour l'oranger et le citronnier, et la conductance maximale entraînant un rendement zéro chez les trois espèces est de 8 dS/m (80mM de NaCl).

L'agrumiculture s'est développée dans les régions semi-arides et spécialement dans le bassin méditerranéen où les sols deviennent de plus en plus salins à cause de l'irrigation. Le bassin méditerranéen comprend 25 pays dont 8 courent le risque de la désertification. La sélection de variétés résistantes au stress hydrique et salin, ainsi que l'amélioration des techniques agricoles, permettraient donc la sauvegarde des agrumes du bassin méditerranéen et le développement d'une agriculture écosoutenable en raison d'une demande d'irrigation plus faible.

Tableau 2. Exemples d'espèces cultivées classées selon leur sensibilité à la salinité.

Sensible	Modérément sensible	Modérément tolérante	Tolérante
Pomelo	Luzerne	Betterave rouge	Betterave à sucre
Orange	Brocoli	Olive	Coton
Citron	Chou	Soja	Dattier
Amande	Tomate	Blé	Cynodon
Pomme	Laitue		
Avocat	Maïs		
Haricot	Concombre		
Carotte	Raisin		
Oignon	Arachide		
Pêche	Pomme de terre		
Fraise	Radis		
Prune	Riz		
	Canne à sucre		

(D'après Jensen, 1980)

II. Les agrumes

1. Origine et taxonomie des agrumes

Selon Tanaka (1961), les agrumes sont originaires du Sud-Est asiatique. Le principal centre d'origine se situerait sous la ligne allant du Nord-Est de l'Inde au nord de la Birmanie et au sud de l'île de Hainan. A partir de cette zone, la dispersion se serait effectuée d'abord vers l'est de l'Inde, l'archipel Malais, le sud de la Chine puis vers le monde entier.

Les agrumes regroupent trois genres sexuellement compatibles, le genre *Fortunella* désignant les kumquats comptant 2 à 4 espèces selon les taxonomistes, le genre monospécifique *Poncirus* (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf) utilisé majoritairement en tant que porte-greffe du fait de ses nombreuses résistances aux contraintes biotiques et le genre *Citrus* renfermant les principales espèces cultivées et consommées (les orangers (*Citrus sinensis* (L.) Obs.), les mandariniers (*C. reticulata* Blanco), les clémentiniers (*C. clementina* hort. ex Tanaka), les citronniers (*C. limon* (L.) Burm. f.), les pomelos (*Citrus x paradisi* Macfad.), les cédratiers (*C. medica*) et les bigaradiers (*C. aurantium* L.) selon Swingle and Reece (1967)). 156 espèces ont été recensées dans le genre *Citrus* par Tanaka (1961) tandis que Swingle et Reece (1967) n'en distinguent que 16. De nombreux hybrides ont été élevés au rang d'espèces par Tanaka (1961). Les trois genres d'agrumes appartiennent avec 8 autres genres dont *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Clymenia*, *Citropsis* et *Severinia* à la sous-tribu des *Citrinae*, tribu des *Citreae*, sous-famille des *Aurantioideae*, famille des *Rutaceae* et à l'ordre des *Géraniales* (Swingle et Reece, 1967).

2. La diversité des agrumes et ses limites d'exploitation

La diversité agromorphologique des agrumes est considérable. Elle concerne aussi bien les caractères pomologiques et organoleptiques que les résistances aux facteurs biotiques et abiotiques. Cependant en regard de la très grande diversité et de la complète compatibilité sexuelle théorique entre les différents genres constituant les agrumes, les ressources génétiques effectivement exploitées par voie sexuée apparaissent très restreintes et très peu de cultivars commerciaux sont issus des programmes d'amélioration conventionnelle. Les principaux facteurs limitant pouvant expliquer cet état de fait sont :

- (1) la polyembryonnie (forme d'apomixie partielle résultant de la prolifération d'embryons à partir des tissus nucellaires de l'ovule), qui a considérablement limité les brassages génétiques au sein des agrumes, tant durant la domestication (Ollitrault et Faure, 1992) que depuis la mise en place de programmes de création variétale pour lesquels chaque combinaison parentale inclut généralement un géniteur femelle mono-embryonné. Seuls les cédratiers, les pamplemoussiers et quelques mandariniers produisent des graines mono-embryonnées d'origine zygotique ;
- (2) les stérilités mâles et femelles, sélectionnées par l'homme pour la production de fruits sans pépins, ont également exclu de nombreux cultivars élités du pool génique exploitable par voie sexuée ;
- (3) l'hétérozygotie élevée de l'essentiel du germoplasme qui se traduit par de faibles probabilités d'associer de nombreux gènes favorables chez un même hybride ;
- (4) la longueur de la phase juvénile et la lourdeur des évaluations qui demandent un pas de temps minimum de dix ans entre deux cycles de recombinaison.

3.La diversité des agrumes et la variabilité des résistances aux facteurs biotiques et abiotiques

La variabilité des résistances aux contraintes biotiques et abiotiques est considérable chez les agrumes et ouvre de très larges perspectives pour la création variétale. De nombreuses tolérances aux facteurs abiotiques ont ainsi été identifiées : tolérance aux sols calcaires de *Citrus jambhiri*, *C. macrophylla*, *C. volkameriana* et de *C. amblycarpa* ; tolérance à la salinité du limettier Rangpur et du mandarinier Cléopâtre ; tolérance au froid des mandariniers Satsuma, des kumquats et du *Poncirus trifoliata* ; tolérance à la sécheresse du limettier Rangpur. Des résistances aux principaux ravageurs et maladies sont également présentes : la résistance aux *Phytophthoras* sp. de certains pamplemoussiers et mandariniers, des bigaradiers, de *C. volkameriana*, et de *C. amblycarpa* ; l'immunité à la tristeza de *Poncirus trifoliata* et résistance partielle du mandarinier Cléopâtre, de *C. amblycarpa*, du limettier Rangpur, de *C. jambhiri* et *C. volkameriana* et la résistance aux nématodes de *Poncirus trifoliata*.

4. Le greffage des agrumes : moyen d'adaptation aux facteurs environnementaux

Jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle, les agrumes étaient multipliés par semis (orangers), par marcottage aérien (mandariniers en Asie) ou par bouturage (cédratiers). La technique du greffage a été utilisée en agrumiculture pour lutter contre les maladies puis pour l'adaptation des agrumes aux contextes pédoclimatiques, enfin les porte-greffe se sont avérés jouer aussi un rôle important en matière de rendement et de qualité des fruits.

Dans les zones de production agrumicole du bassin méditerranéen, les agrumes se trouvent confrontés à de fortes contraintes environnementales. En effet, on y trouve associées des contraintes abiotiques majeures (salinité, sols calcaires) et des pressions sanitaires élevées (*Phytophthora* sp., nématodes) considérablement aggravées, ces dernières décennies, par la dispersion de la tristeza sur la quasi-totalité du bassin méditerranéen.

Dans le paragraphe suivant nous présentons les caractéristiques agronomiques et physiologiques des agrumes utilisés en tant que porte-greffe dans le bassin méditerranéen.

- *Citrus aurantium* : le bigaradier

Le bigaradier a été largement utilisé comme porte-greffe jusqu'à l'apparition du virus de la tristeza. Dans le bassin méditerranéen, ce porte-greffe est toujours utilisé dans les régions indemnes du virus et dans des associations avec les citronniers. Le bigaradier est caractérisé par un système racinaire dense et profond qui lui confère une très haute tolérance à la sécheresse. Il est tolérant au froid, modérément tolérant aux conditions salines et tolérant aux sols calcaires et au champignon du *Phytophthora* sp.

- *Citrus reshni* cv. 'mandarinier Cléopâtre'

Le mandarinier Cléopâtre est l'un des porte-greffes les plus tolérants au sel. Il est tolérant au froid comme la majorité des mandariniers et induit une haute tolérance à la variété quand il est utilisé comme porte-greffe. Son système racinaire semi-profond modère sa tolérance à la sécheresse.

- *Citrus deliciosa* cv. 'mandarinier commun'

Le mandarinier commun n'est pas utilisé comme porte-greffe à cause de sa forte sensibilité au *Phytophthora*. En revanche, il présente une bonne tolérance aux contraintes saline et calcaire comme le mandarinier Cléopâtre. En tant que variété, le mandarinier commun disparaît aujourd'hui progressivement des vergers de production en raison de la quantité abondante de pépins dans les fruits, qui le déprécie sur le marché européen.

- *Poncirus trifoliata* L. Raf. cv. 'Pomeroy'

Le *Poncirus* est l'agrumes le plus tolérant au froid. Ses feuilles caduques et trifoliées et les caractéristiques de son fruit l'ont fait classer dans un genre à part par les taxonomistes. Il est toutefois sexuellement compatible avec les *Citrus* avec lesquels ont été produits des hybrides fertiles tels que les citranges Carrizo et Troyer utilisés aussi comme porte-greffe. Il a été largement utilisé comme porte-greffe pour ses multiples résistances aux pathogènes tels que le *Phytophthora*, le virus de la tristezza et les nématodes. Aujourd'hui le *Poncirus* est progressivement retiré des vergers d'agrumes à cause de sa forte sensibilité aux chlorures, au calcaire et à la sécheresse.

- L'hybride citrange Carrizo (*Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.)

L'hybride sexué intergénérique entre le *Poncirus trifoliata* L. Raf et l'oranger Washington Navel (*Citrus sinensis* L. Osb) a été créé en Floride en 1909 dans la perspective d'obtenir une variété résistante au froid. Plus tard dans les années soixante, il a été utilisé comme porte-greffe. Comme le citrange Troyer (issu d'une même hybridation), le citrange Carrizo a été beaucoup utilisé pour contrer l'épidémie mondiale de la tristezza. Aujourd'hui, le citrange Carrizo représente le porte-greffe le plus utilisé dans plusieurs pays agrumicoles des zones tropicale et subtropicales. Il est en effet résistant au virus de la tristezza, au *phytophthora* (excepté quand il est greffé avec du clémentinier). Le citrange Carrizo est modérément plus tolérant aux chlorures et au calcaire et reste aussi tolérant au froid que le *Poncirus*.

5. Accumulation des ions Na^+ et Cl^- chez les agrumes greffés : exemples d'association porte-greffe / greffon

De nombreux travaux ont porté sur l'influence des associations porte-greffe / greffon sur l'accumulation des ions Na^+ et Cl^- .

- En 1995, Bañuls and Primo-Millo ont montré que l'accumulation foliaire en Cl^- chez les greffons (Clémentine, Navel orange) sur mandarinier Cléopâtre est inférieure à celle de ceux greffés sur citrange Troyer. Par ailleurs, l'accumulation foliaire en Na^+ chez le Clémentinier greffé sur les deux précédents porte-greffe est moindre que celle observée pour l'oranger Navel.
- En 1993, Garcia Legaz *et al.*, ont mentionné que les greffons de citronnier (Fino, Verna, Ste Theresa et Eureka) sur *C. macrophylla* ont un contenu foliaire plus faible en Na^+ et Cl^- que lorsqu'ils sont greffés sur *C. volkameriana* ou sur le bigaradier. Ces résultats sont inversés au niveau racinaire.
- Nieves *et al.*, (1992) ont indiqué que les combinaisons bigaradier/citronnier cv. Verna ainsi que mandarinier Cléopâtre/citronnier cv. Verna présentent des comportements de type excluant pour le Cl^- .
- Cooper and Gorton, (1952) et Cooper, (1961), ont mentionné que les greffons de pomelo sur la lime Rangpur ou sur le mandarinier Cléopâtre accumulent généralement les concentrations foliaires en Cl^- les plus faibles comparativement aux autres porte-greffe. Ils concluent que ces deux porte-greffe sont des excluants du Cl^- .
- Elgazzar *et al.*, (1965) ont indiqué que les greffons de Citron Eureka sur *P. trifoliata* accumulent des concentrations inférieures en Na^+ foliaire comparé aux autres porte-greffe ce qui indique que ce porte-greffe est un excluant de Na^+ .

6.Création de nouveaux porte-greffe cumulant des tolérances aux facteurs biotiques et abiotiques

6.1.Création par hybridation sexuée

Sur la base de tests agronomiques et de symptômes de toxicité aux chlorures associés à des analyses foliaires, un classement de la sensibilité au sel existe (Chapman, (1968) ; Sykes, (1985)). Ces données sont connues au sein du pool génétique des agrumes pour les principales espèces et servent de base aux programmes d'amélioration. Il est par ailleurs connu que certains des caractères recherchés pour un porte-greffe sont présents au sein du germoplasme d'agrumes (Ollitrault *et al.*, 2000). Il est ainsi possible d'identifier des parents très complémentaires pour les tolérances aux stress biotiques et abiotiques.

La difficulté d'obtenir par hybridation sexuée des hybrides adaptés au faisceau de contraintes présentes dans le bassin méditerranéen résulte de la structure génétique des agrumes souvent fortement hétérozygote et à ses conséquences sur la recombinaison sexuée. La probabilité d'obtenir des hybrides recombinants cumulant l'ensemble des gènes désirés des deux parents (Ollitrault *et al.*, 2000) est en effet très faible, car au-delà des tolérances au sel et à la Tristeza, il convient d'associer des tolérances aux *Phytophthora* sp, aux nématodes, aux sols calcaires et des caractères favorables au rendement et à la qualité des fruits.

6.2.Création par hybridation somatique

Des porte-greffe tolérants aux contraintes abiotiques méditerranéennes existent mais ils ne satisfont pas forcément en termes de résistance aux maladies et aux ravageurs et en termes de rendement et qualité des fruits. La sélection et l'évaluation ainsi que la création de nouveaux porte-greffe sont plus que jamais une nécessité. Compte tenu des difficultés rencontrées par l'amélioration conventionnelle, le développement de l'hybridation somatique (fusion de protoplastes) est devenu une voie très prometteuse, permettant d'additionner l'ensemble des génomes nucléaires de porte-greffe présentant des caractéristiques complémentaires pour leur tolérance ou résistance aux contraintes biotiques et abiotiques. L'hybridation somatique est développée avec succès par le Citrus Research and Education Center de l'Université de Floride, qui a obtenu et régénéré des hybrides interspécifiques et intergénériques allotétraploïdes à partir d'une centaine de combinaisons parentales. Ces hybrides sont en

cours d'évaluation agronomique (Grosser, 1992, 1994, et 2000). Des travaux équivalents bien que de moindre ampleur et ciblés sur les contraintes du bassin méditerranéen sont également en cours au CIRAD (Ollitrault *et al.*, 2000).

Le *Poncirus trifoliata* et certains de ses hybrides avec les *Citrus* (citrange Carrizo : *C. sinensis* x *P. trifoliata* ; citrumello 4475 : *C. paradisi* x *P. trifoliata*) apportent des résistances aux principaux facteurs biotiques tandis que de nombreuses tolérances aux stress abiotiques peuvent être trouvées chez les *Citrus*. Plusieurs combinaisons intergénériques entre le *Poncirus* ou ses hybrides avec des *Citrus* ont été réalisées et sont à différents stades de régénération et d'évaluation agronomique. Un premier hybride intergénérique entre *Poncirus trifoliata* cv. Pomeroy et le mandarinier commun (*C. deliciosa* Ten. cv. Willow leaf) a été créé par le CIRAD. Cette hybride est appelée FLHORAG1 et semble prometteur face aux contraintes du bassin méditerranéen. Il a en effet hérité l'immunité à la Tristeza du *Poncirus trifoliata* et présente également un comportement excellent sur sol calcaire à l'image du mandarinier commun. Le FLHORAG1 a montré une forte tolérance au stress salin dans des études antérieures réalisées par Mademba-Sy (2004) et Saleh (2005 et 2008).

III.Déroulement de la réponse au stress salin (NaCl) chez les plantes

En condition de contrainte saline, les plantes subissent un stress hydrique dû à l'augmentation des forces de rétention de l'eau dans le sol. La forte accumulation des sels autour des racines les empêche de capter l'eau, ce qui entraîne une baisse du potentiel hydrique de la plante. Le manque d'eau entraîne alors un stress osmotique au niveau des cellules et des tissus se traduisant par l'augmentation de la concentration en solutés et en ions dans le milieu intracellulaire. En réponse à tous ces changements, plusieurs mécanismes de régulation sont mis en place pour ajuster le métabolisme cellulaire et faire face aux dommages provoqués par la perte d'eau et par l'accumulation des ions à un niveau toxique dans les différents organes de la plante. Les mécanismes de régulation sont accompagnés par l'enclenchement de cascades de signalisation et l'activation de facteurs de transcription qui entraînent des changements au niveau de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'effecteurs de l'adaptation au stress. Ces derniers vont permettre de maintenir l'homéostasie ionique, la biosynthèse d'osmolytes, le piégeage de radicaux toxiques, le transport d'eau et, enfin, la coordination de la réponse (Apse *et al.*, (1999) ; Zhu, (2002) ; Hasegawa *et al.*, (2000) ; Berthomieu *et al.*, (2003)) (Figure 5).

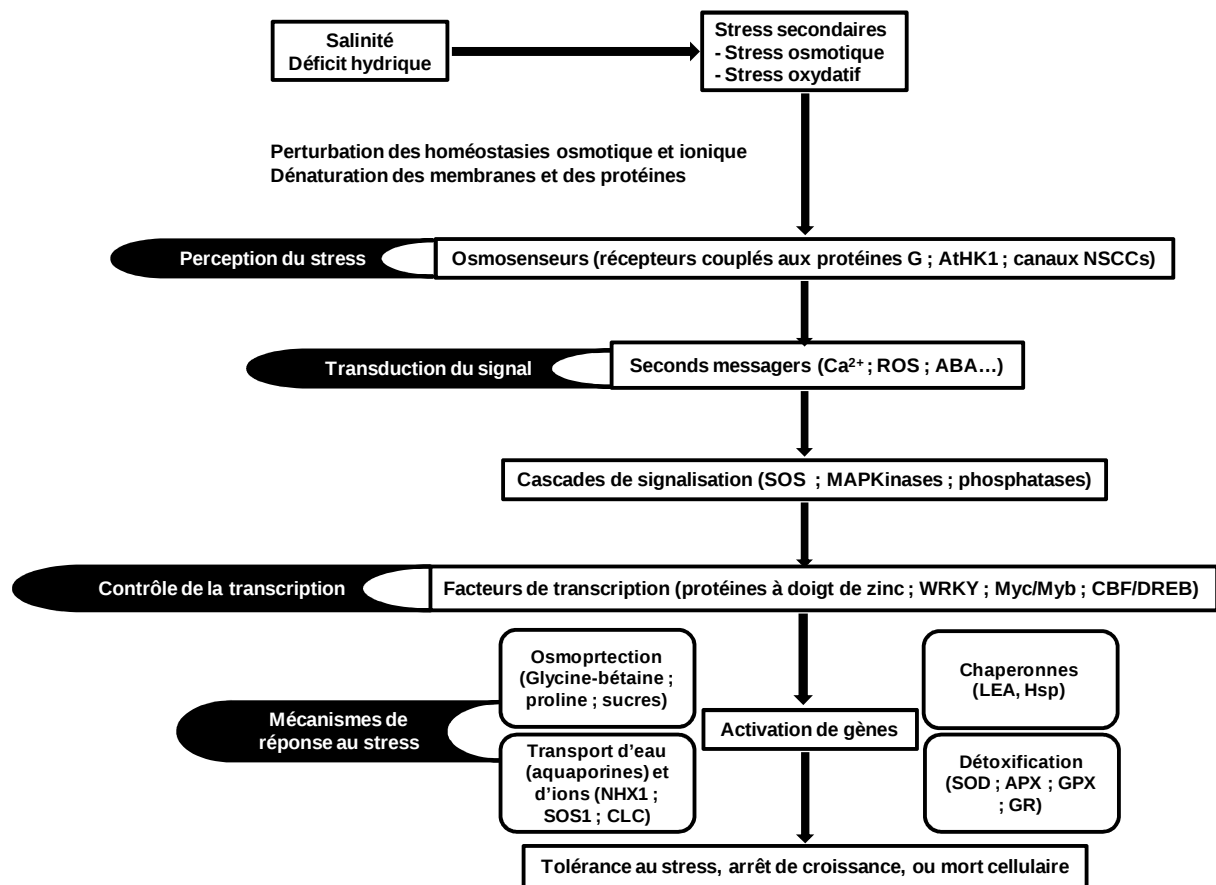


Figure 5. Schéma général du déroulement de la réponse aux stress hydrique et salin chez les plantes (d'après Wang *et al.*, (2003a) et Xiong *et al.*, 2002).

La toxicité ionique résulte de l'assimilation excessive des ions Na^+ et Cl^- par la plante. La croissance d'une plante sous la contrainte saline dépend de sa capacité à rétablir son propre équilibre ionique. En effet la concentration en Na^+ et Cl^- au niveau du cytosol est maintenue faible par d'une part, la régulation de l'assimilation de ces ions, et d'autre part, par leur compartimentation au niveau de la vacuole et par leur exclusion extracellulaire. La compartimentation vacuolaire contribue au maintien des relations hydriques des cellules en milieu hypertonique. Lorsque l'accumulation des ions dépasse la capacité de leur redistribution entre les différents tissus et organes et/ou dépasse la capacité de compartimentation vacuolaire, les ions se concentrent jusqu'à un niveau toxique dans le cytosol. Le Na^+ , par compétition, réduit l'absorption des ions K^+ (cofacteurs de nombreuses enzymes) dans la cellule, pénètre au niveau du cytosol à travers des transporteurs *High affinity K^+ Transporter* (HKT1) et des canaux non sélectifs de cations (VI-NSCC), puis déclenche la réponse au stress suite à une augmentation de la concentration d'ions Ca^{2+} cytosolique (Hasegawa *et al.*, (2000) ; Yokoi *et al.*, (2002)).

Le Ca^{2+} va alors activer les cascades de phosphorylation des MAPkinases (MAPK), aboutissant à l'activation de facteurs de transcription qui agissent spécifiquement sur les promoteurs pour initier la réponse (notamment par la transcription des gènes Salt Overly Sensitive (SOS) et des gènes de biosynthèse des osmolytes) (Yokoi, *et al.*, 2002). La voie SOS activée va induire l'activation de la protéine SOS1, un antiport Na^+/H^+ de la membrane plasmique, et l'activation de l'antiport Na^+/H^+ exchanger (NHX1) de la vacuole (Zhu, 2002). Ainsi les ions Na^+ et Cl^- sont soit évacués hors du cytoplasme vers les tissus conducteurs par l'intermédiaire de l'antiport Na^+/H^+ (SOS1) et de canaux Cl^- , soit stockés dans la vacuole par l'intermédiaire de l'antiport NHX1, de canaux Cl^- (CLC) et d'antiports Cl^-/H^+ (Hasegawa *et al.*, (2000) ; Zhu, (2002)) en coordination avec des pompes à protons ATP ou PPI dépendantes.

Par ailleurs, l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique va permettre la transduction du signal afin d'activer l'accumulation de métabolites compatibles dans la cellule. Ceux-ci vont permettre l'ajustement osmotique cellulaire en abaissant le potentiel osmotique interne par captage des molécules d'eau à leur surface. Ils représentent aussi une source d'azote et de carbone qui va diminuer les perturbations métaboliques lors du stress. Ces métabolites peuvent être des sucres, des alcools, mais aussi des ions K^+ et des métabolites chargés tels que la glycine bêtaïne et la proline (Yokoi *et al.*, 2002). De plus, et toujours dans le but de réguler son potentiel hydrique, la plante peut faire varier la conductivité hydraulique à la racine et aux feuilles. Ceci se produit au niveau des membranes cellulaires, des vésicules internes ou du tonoplaste, par régulation de l'ouverture des protéines de transport d'eau 'les aquaporines' ou par modification de leur quantité (Morillon & Chrispeels, 2001).

La réponse au stress salin est associée au transport de l'acide abscissique (ABA) de la racine vers les parties aériennes (Hasegawa *et al.*, 2000). L'ABA est une phytohormone de stress chez la plante, dont la principale caractéristique est d'inhiber la germination des graines et d'induire la fermeture des stomates. La fermeture des stomates permet la régulation du potentiel hydrique en réduisant les pertes d'eau par la transpiration, et limite la fixation du CO_2 entraînant la réduction de l'activité photosynthétique. Toutes ces perturbations des échanges gazeux de la plante entraînent la production massive des espèces actives de l'oxygène ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) soumettant la plante au stress oxydatif. L'ABA joue aussi un rôle régulateur des facteurs de transcription ABA dépendants qui, par leur interaction spécifique avec les promoteurs inductibles, vont pouvoir opérer une modulation transcriptionnelle des gènes de réponse au stress salin (Zhu, 2002).

La tolérance au stress salin dépend aussi des piègeurs des espèces actives de l'oxygène ROS (les molécules antioxydantes tels que l'ascorbate, la vitamine E et les caroténoïdes, et les enzymes de détoxification telles que la superoxyde dismutase SOD, l'ascorbate peroxydase APX...). Afin de limiter les dommages causés par l'accumulation des ROS, il est nécessaire d'avoir une régulation de l'expression de ces piègeurs pour une réponse adaptée. Les espèces actives de l'oxygène sont très dommageables à forte dose pour la cellule, mais à faible dose, ils jouent le rôle de seconds messagers dans la signalisation du stress (Zhu, 2002).

IV.Déterminants physiologiques de la tolérance au stress salin chez les plantes : état de connaissances chez les agrumes

1.La croissance

La croissance d'une plante dépend à la fois de l'expansion et de la division cellulaire. Etant dépendante de la turgescence, l'expansion cellulaire est très sensible au déficit hydrique et est sous le contrôle de la signalisation ABA. En conditions salines, l'altération du statut hydrique engendre la réduction de la turgescence des cellules réduisant ainsi leur expansion et leur taille et réduisant l'utilisation de l'eau par la plante. Ce fait va entraîner la réduction du développement des nouvelles racines, feuilles et ramifications latérales (Spollen *et al.*, 1993). Si la durée du stress est courte, la récupération de la plante est complète. En revanche, si la durée est longue, la récupération peut être très limitée car le stress aurait déjà réduit le nombre de cellules dans les zones de division cellulaire.

La croissance des agrumes et leur rendement sont généralement réduits dans un sol à E_{Ce} autour de 1,4 dS/m (Maas, 1993). Comme chez la majorité des plantes la réduction de la croissance (hauteur de la plante, émission foliaire, biomasse, système racinaire) a été également observée chez les agrumes soumis au stress salin (Cerdeza *et al.*, (1990) ; Zekri and Parsons, (1992) ; Camara-Zapata *et al.*, (2004)). La croissance des agrumes greffés est réduite au niveau des racines en condition de salinisation croissante. Cet effet phénotypique du stress salin a été plus remarqué chez les agrumes greffés sur mandarinier Cléopâtre ou Macrophylla que chez les agrumes greffés sur bigaradier. Le *Poncirus trifoliata* lui maintient un développement continu de son système racinaire. Ce phénomène est appelé "Fine Root Turnover", il est unique au *P. trifoliata* et lui permet d'éliminer l'excès d'ions (Tozlu *et al.*,

2000). A contrario des racines, l'élongation des tiges et des ramifications sont très fortement réduites par le stress chez ce génotype. Romero-Aranda *et al.*, (1998) ont observé une augmentation de l'épaisseur des feuilles chez les porte-greffe citrange Carrizo et mandarinier Cléopâtre soumis au stress salin. Ceci s'expliquerait par une augmentation de la turgescence des cellules foliaires suite au stress salin (Maas, 1993).

2.La régulation stomatique et des échanges gazeux

L'ascension de l'eau ne nécessite pas d'énergie métabolique. Elle est essentiellement assurée par la transpiration au niveau des stomates des feuilles. On considère que l'air est pratiquement saturé en vapeur d'eau dans la chambre sous-stomatique, alors qu'à l'extérieur de la feuille, l'air est renouvelé et n'est pas dans les conditions de saturation. C'est ce gradient de vapeur d'eau qui va provoquer l'évaporation au niveau des stomates. Cette évaporation va attirer l'eau des cellules et, de proche en proche, la dépression va être transmise à toute la colonne d'eau des vaisseaux du xylème jusqu'à l'extrémité des racines (Bonner et Galston, 1952). La colonne de sève sous tension, c'est à dire à une pression négative, va rester cohérente grâce aux liaisons hydrogène entre les molécules d'eau dipolaires et aux forces d'adhésion de ces molécules aux parois des vaisseaux. Un arbre de 100 m de hauteur est sur ce plan l'équivalent de colonnes d'eau s'étendant des feuilles aux extrémités des racines (Steudle, 1995). L'eau peut donc être sous une pression négative de 10 bars ou plus au niveau des racines. Ce mécanisme de montée de la sève implique donc une forte déperdition en eau.

Lorsque le potentiel hydrique du sol décroît celui des feuilles doit être baissé afin de créer le gradient différentiel qui permet la conduction de l'eau vers les parties aériennes. En situation de déficit hydrique la plante ferme ses stomates afin de réduire la perte d'eau par évaporation. La fermeture des stomates est régulée par l'hormone ABA, qui est synthétisée au niveau des feuilles et des racines des plantes stressées (Skriver and Mundy, 1990). L'ABA induit la sortie des ions K^+ à l'extérieur des cellules de garde stomatiques provoquant ainsi la baisse de leur turgescence et la fermeture des stomates. De même un apport exogène d'ABA sur les feuilles induit la fermeture des stomates (Hartung and Davies, 1991). Dans le but de diminuer les effets néfastes du sel chez les plantes, des traitements avec différents régulateurs de croissance ont été étudiés. Les pré-traitements à l'ABA augmentent la tolérance au sel chez diverses espèces telles que le tabac (LaRosa *et al.*, 1987), l'orge (Popova *et al.*, 1995), et les agrumes (Gomez-Cadenas *et al.*, 2003).

Les agrumes répondent de façon immédiate, au déficit hydrique et à la salinité, par l'augmentation de la production endogène d'ABA (Gomez-Cadenas *et al.*, 1996, 1998), ce qui entraîne la réduction de l'assimilation du CO₂ et de la conductance stomatique (Walker *et al.*, (1982) ; Lloyd *et al.*, (1990) et Gomez-Cadenas *et al.*, (2003)).

3.La photosynthèse

Le stress salin réduit le taux de photosynthèse (Kawasaki *et al.*, 2001), ce qui en conséquence entraîne la réduction de la croissance. Plusieurs études ont prouvé l'importance du photosystème II dans la réponse photosynthétique aux changements environnementaux (Baker, 1991). Cependant la réponse du PSII est contrastée selon le niveau de tolérance au stress salin des espèces. Certaines études ont montré l'inhibition de l'activité du PSII (Bongi and Loreto, (1989) ; Mishra *et al.*, (1991) ; Masojidek and Hall, (1992) ; Belkhodja *et al.*, (1994) ; Everard *et al.*, (1994)), alors que d'autres n'ont observé aucun effet négatif du stress salin sur le PSII (Robinson *et al.*, (1983) ; Brugnoli and Bjorkman, (1992) ; Morales *et al.*, (1992)).

La salinité diminue l'assimilation du CO₂ via les réductions de la surface foliaire (Papp *et al.*, 1983; Munns *et al.*, 2000), de la conductance stomatique (Brugnoli and Lauteri, (1991) ; Ouerghi *et al.*, (2000) ; Agastian *et al.*, (2000) ; Parida *et al.*, (2003)), et de l'efficacité des enzymes photosynthétiques (Seemann and Critchley, (1985) ; Yeo *et al.*, (1985) ; Brugnoli and Bjorkman, (1992) ; Reddy *et al.*, (1992)). Par ailleurs le stress salin peut inhiber la réparation du PSII via la suppression de la synthèse de la protéine D1 au niveau transcriptionnel et traductionnel (Allakhverdiev *et al.*, 2002).

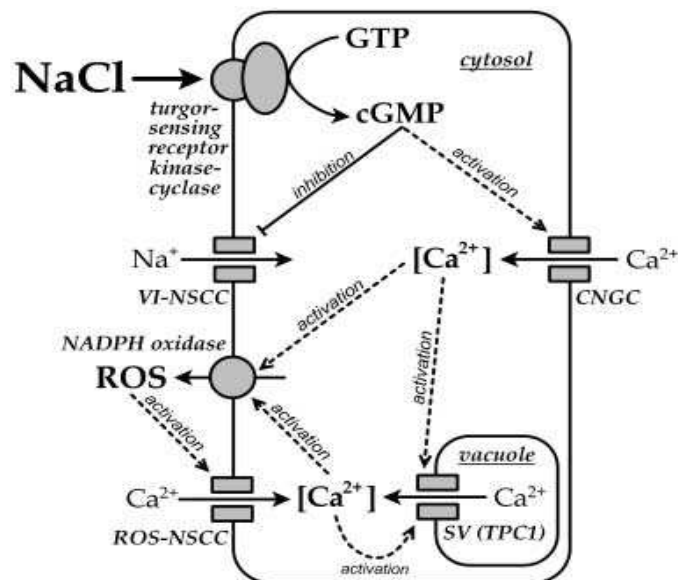
V.Déterminants moléculaires de la tolérance au stress salin chez les plantes : état de connaissance chez les agrumes

Le stress salin se traduit par des changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires au niveau de la plante. L'identification des déterminants de la tolérance au stress salin et des effecteurs qui contrôlent l'expression de ces déterminants devient aujourd'hui indispensable pour la sélection et l'amélioration des espèces cultivées. L'adaptation de la plante au stress salin dépend de l'activation d'un réseau complexe de cascades moléculaires impliquées dans la perception du stress, la transduction du signal du

stress, et l'expression de gènes et de métabolites spécifiques pour l'adaptation au stress (Figure 5).

1. La perception du stress salin

Le stress salin est perçu au niveau des racines par différents senseurs membranaires. L'ion Na^+ pénètre dans les cellules racinaires par voie passive via des canaux non sélectifs de cations NSCC de type VI (indépendants du voltage du plasmalemme) et de type DA (activés par la dépolarisation du plasmalemme) (Shabala *et al.*, 2006) (Figure 6). Une des premières réponses cellulaires au stress salin est la chute de la turgescence qui conduit à des changements structuraux de la membrane. Ces changements sont détectés par un récepteur kinase-cyclase membranaire qui va rapidement catalyser la conversion du guanosine 3'-triphosphate (GTP) en 3', 5'- guanosine monophosphate cyclique (cGMP). L'augmentation de la concentration cytosolique en cGMP va entraîner l'activation de l'influx du Ca^{2+} via des canaux ioniques non sélectifs membranaires CNGC (Talke *et al.*, 2003) et l'inactivation des canaux membranaires VI-NSCC afin de réduire l'influx du Na^+ (Matthuis and Sanders, (2001) ; Rubio *et al.*, (2003)).



(D'après Demidchik and Maathuis, 2007)

Figure 6. Implication des canaux non sélectifs de cations (NSCC) dans la perception et la transduction du signal du stress salin.

2. La transduction du signal du stress salin

2.1. Les cations Ca^{2+}

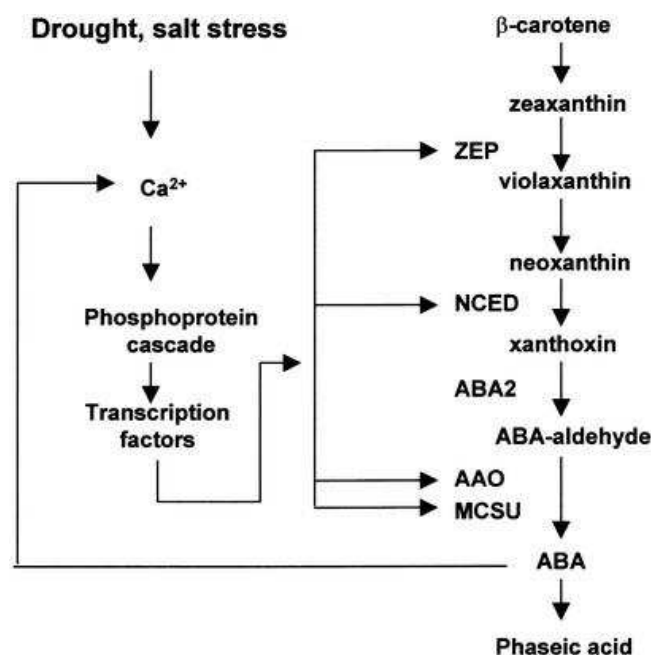
L'augmentation transitoire de la concentration cytosolique en Ca^{2+} favorise :

- (1) la libération des stocks intracellulaires en Ca^{2+} tels que les vacuoles en activant les canaux NSCC vacuolaires (SV-NCSS) (Peiter *et al.*, 2005) (Figure 6),
- (2) la production des ROS par les oxydases membranaires telles que la NADPH oxydase et certaines peroxydases. En effet, les ROS favorisent un influx supplémentaire de Ca^{2+} dans la cellule via les canaux ROS-NSCC (Figure 6),
- (3) et l'activation de diverses protéines fixatrices de Ca^{2+} responsables de l'activation de différentes cascades de signalisation du stress (SOS, MAPK).

2.2. L'hormone ABA (Acide ABscissique)

L'ABA est une phytohormone intervenant dans différents processus physiologiques et développementaux chez les plantes tels que la maturation, l'induction de la dormance chez les embryons, l'inhibition de la germination et dans l'adaptation aux différents stress environnementaux (Zeevaart and Creelman, 1988).

L'ABA est synthétisé à partir de la xanthoxine via la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Naqvi, 1995). Chez les plantes supérieures, l'ABA dérive des deux C40-*cis*-epoxycaroténoïdes, la 9-*cis*-neoxanthine et la 9-*cis*-violaxanthine, qui sont clivés sous l'action de la 9-epoxycarotenoid-dioxygenase (NCED) pour produire le précurseur direct de l'ABA, la xanthoxine (Cutler and Krochko, (1999) ; Liotenberg *et al.*, (1999) ; Taylor *et al.*, (2000)) (Figure 7). L'hormone ABA est synthétisée au niveau des racines et du mésophylle puis est redistribuée et accumulée au niveau des feuilles. La perception de l'ABA au niveau des cellules de garde stomatiques va induire l'accumulation du Ca^{2+} au niveau cytosolique due à un influx à travers les canaux NSCC de la membrane plasmique (Murata *et al.*, 2001). Parallèlement, l'activation de l' H^+ /ATPase tonoplastique induit l'alcalinisation du cytosol favorisant ainsi l'efflux du Ca^{2+} de la vacuole.



(D'après Xiong *et al.*, 2002)

Figure 7. Voie et régulation de la biosynthèse de l'ABA.

La forte concentration cytosolique en Ca^{2+} entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique menant à l'inhibition des canaux K^+ entrants et à l'activation des canaux K^+ sortants du tonoplaste et de la membrane plasmique (Blatt and Armstrong, 1993) et des canaux anioniques de la membrane plasmique (Grabov *et al.*, 1997). L'efflux massif de K^+ et des anions Cl^- à travers la membrane plasmique engendre la plasmolyse des cellules de garde, ce qui conduit à la fermeture du stomate.

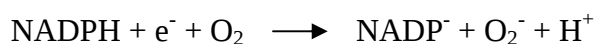
Outre son rôle dans la régulation stomatique, l'ABA serait impliqué dans la réduction de la croissance en réponse au stress osmotique (Giraudat *et al.*, 1994). L'ABA serait aussi impliqué dans la régulation de la synthèse des protéines Late Embryogenesis Abundant (LEA) et de l'enzyme-clé de la voie de biosynthèse de la proline, la delta1 pyrroline carboxylate synthase (P5CS). Chez *Arabidopsis*, l'apport exogène en ABA induit l'expression de gènes *LEA* (Dure, (1993) ; Hundertmark and Hinch, (2008)) et *P5CS* au niveau des feuilles (Yoshida *et al.*, 1995).

Chez les plantes en condition de déficit hydrique, l'accumulation de l'ABA au niveau foliaire est corrélée avec l'accumulation des transcrits du gène *NCED* (Xiong and Zhu, (2003) ; Nambara and Marion-Poll, (2005)). L'induction de l'expression du gène *NCED* en situation

de stress hydrique a été observée chez le haricot (Iuchi *et al.*, 2000) et chez *Arabidopsis* (Tan *et al.*, (2003) ; Wan and Li, (2006)). Les plants transgéniques surexprimant le gène *NCED* synthétisent et accumulent de fortes quantités d'ABA et développent une tolérance accrue au déficit hydrique comme observé chez le tabac (Thompson *et al.*, 2000), *Arabidopsis* (Iuchi *et al.*, 2001) et *Nicotiana glauca* transgéniques (Qin and Zeevaert, 2002). Chez les agrumes en condition de stress salin, l'accumulation de l'ABA a été rapportée au niveau des racines, du xylème et des feuilles (Gomez-Cadenas *et al.*, 1998). Chez l'oranger, l'accumulation de l'ABA a été corrélée à l'induction du gène *CsNCED1* au niveau des feuilles (Rodrigo *et al.*, 2006).

2.3. Les Espèces actives de l'oxygène 'ROS'

Les ROS sont produits dans différents compartiments cellulaires (Halliwell and Gutteridge, 1989) dès lors que le potentiel redox du compartiment cellulaire est modifié (Asada, 1994) : lors de certaines transitions développementales telles que la maturation des graines (Oracz *et al.*, 2007), durant les métabolismes photosynthétiques et respiratoires et dans les conditions de stress. Les mitochondries et les chloroplastes sont les compartiments cellulaires dont l'activité métabolique est la plus oxydante. Ils représentent ensemble la source majeure des ROS dans les cellules végétales. La production des ROS dans les chloroplastes est augmentée lorsque la fixation du CO₂ est limitée par le stress hydrique ou salin. Dans la mitochondrie, la réduction de la chaîne de transport d'électrons est à l'origine de la synthèse de l'O₂⁻ en condition de stress (Moller, 2001). Dans les autres compartiments cellulaires, les ROS proviennent de l'activité des peroxydases membranaires telles que la glycolate oxydase (peroxisomes), l'oxalate oxydase et les amine oxydases (apoplaste) (Hu *et al.*, (2003) ; Walters, (2003) et la NADPH oxydase (cytosol) (Lamb and Dixon, (1997) ; Desikan *et al.*, (1996)). En conditions salines, le Ca²⁺ accumulé dans le cytosol active la NADPH oxydase qui, par le moyen de son flavocytochrome multimérique, agit comme une chaîne de transport d'électrons et réduit l'O₂ en O₂⁻ selon la réaction suivante :



La production d'un radical superoxyde O₂⁻ va induire la synthèse d'autres ROS tels que les radicaux hydroxyle OH⁻ et l'oxygène singulet ¹/₂O. Etant chargé le radical O₂⁻ ne diffuse pas à travers les membranes, sa détoxification est compartimentée dans les zones de production. Au

cours de l'élimination du radical O_2^- , une réaction catalysée par la superoxyde dismutase SOD, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est formé. H_2O_2 diffuse à travers les membranes via les aquaporines pour atteindre d'autres compartiments et participe en tant que second messenger dans les cascades de signalisation déclenchées lors des mitoses, de la mort cellulaire (Foyer and Noctor, 2005) et en réponse aux stress (Mullineaux *et al.*, 2000).

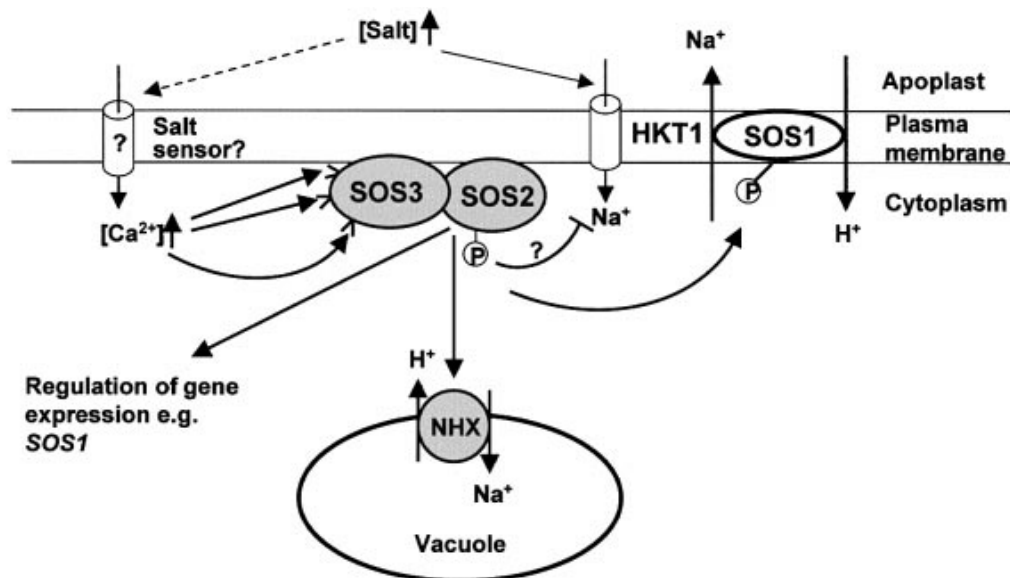
Les ROS jouent le rôle de seconds messagers indispensables dans l'activation des cascades de signalisation tel que la cascade MAPK, et dans l'amplification des défenses de la cellule au stress (Dat *et al.*, (2003) ; Rizhsky *et al.*, (2004) ; Vandenabeele *et al.*, (2004)). De plus ils contrôlent l'expression de facteurs de transcription tels les WRKY, les protéines à doigt de zinc et les Myb (Rizhsky *et al.*, 2004 ; Vandenabeele *et al.*, 2003). A fortes concentrations dans la cellule, les ROS vont activer les systèmes antioxydants cellulaires incluant les molécules antioxydantes (ascorbate, glutathion...) et les enzymes de détoxification (SOD, CAT, APX...).

3. Les cascades de signalisation

3.1. La voie Salt Overly Sensitive 'SOS'

La voie SOS est composée de trois protéines (SOS1, SOS2 et SOS3) impliquées dans la réponse au stress salin. La cascade commence par la fixation du Ca^{2+} sur la protéine SOS3, une protéine senseur fixatrice de Ca^{2+} (Liu and Zhu, 1998). Les modifications conformationnelles provoquées par la liaison du Ca^{2+} vont favoriser la fixation de la protéine SOS2. Cette sérine/thréonine kinase contient un site catalytique kinase à l'extrémité N-terminale et une région régulatrice C-terminale contenant un domaine d'autoinhibition (domaine FISL). Les domaines régulateur et catalytique interagissent entre eux en conditions normales bloquant ainsi le site catalytique. La fixation de SOS3 active SOS2 en relevant son autoinhibition permettant ainsi de libérer son site catalytique (Guo *et al.*, 2001). La première cible identifiée du complexe SOS2-SOS3 est la protéine SOS1, un antiport Na^+/H^+ situé sur la membrane plasmique et responsable de l'exclusion du Na^+ à l'extérieur du cytosol (Shi *et al.*, 2000 et 2002). La kinase du complexe SOS2-SOS3 active l'antiport SOS1 par phosphorylation (Quintero *et al.*, 2002). En outre, le complexe SOS2-SOS3 serait impliqué dans la régulation d'autres effecteurs de la tolérance au stress salin. Il inhiberait le

transporteur à faible affinité de Na^+ (HKT1) (Uozumi *et al.*, 2000) et activerait l'antiport vacuolaire Na^+/H^+ (NHX1) (Qiu *et al.*, 2004) afin que les ions Na^+ soient respectivement empêchés de rentrer dans le cytosol et séquestrés dans les vacuoles (Figure 8). La surexpression des gènes *SOS1* (Shi *et al.*, 2003) et *SOS2* (Guo *et al.*, 2004) ont amélioré la tolérance au stress salin chez *Arabidopsis*.



(D'après Chinnusamy *et al.*, 2004)

Figure 8. Régulation de l'homéostasie des ions Na^+ par la voie SOS durant le stress salin.

3.2. La voie Mitogen-Activated Protein Kinase 'MAPK'

En fonction de l'état oxydatif de la plante soumise au stress salin, la transduction du signal redox se fait au moyen de kinases ou de phosphatases. Les kinases font partie des cascades MAPK activées par les ROS produites par les plantes en réponse à différents stress et à des stimuli mitogènes. Les phosphatases quant à elles jouent le rôle de régulateurs de la voie MAPK.

Chez tous les eucaryotes les voies MAPK sont impliquées dans la régulation de la croissance, la mort cellulaire, la différenciation, la prolifération et les réponses au stress (Garrington and Johnson, (1999) ; Chang and Karin, (2001) ; Jonak *et al.*, (2002) ; Nakagami *et al.*, (2005)). La transduction du signal oxydatif est contrôlée par la phosphorylation des

protéines impliquant la voie MAPK qui est composée de trois types de kinases : MAPKKK, MAPKK et MAPK. En situation de stress oxydatif, une forte production d'ROS et en particulier du H₂O₂ va induire la voie MAPK (Desikan *et al.*, (1999) ; Kovtun *et al.*, (2000) ; Samuel *et al.*, (2000)). Les MAPKKK sont des sérine/thréonine kinases qui activent les MAPKK par phosphorylation des deux résidus sérine/thréonine du motif 'S/T-X₃₋₅-S/T' (Garrington and Johnson, (1999) ; Chang and Karin, (2001)). De même les kinases MAPKK vont à leur tour activer les MAPK par phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine des motifs 'T-X-Y'. Les MAPK, derniers composants de la cascade, sont des sérine/thréonine kinases qui phosphorylent différents substrats tels que les facteurs de transcription et les protéines kinases (Chang and Karin (2001)).

Chez *Arabidopsis thaliana*, les kinases de la voie MAPK sont codées par 20 gènes *MPK* (MAPK group, 2002). Seules les fonctions enzymatiques des MPK1, 3, 4 et 6 ont été révélées, elles sont toutes impliquées dans la signalisation du stress (Ulm *et al.*, (2002) ; Mizoguchi *et al.*, (1996) ; Ichumura *et al.*, (2000) ; Kovtun *et al.*, (2000) ; Asai *et al.*, (2002)). La MPK1 (MAPKKK) interagit avec la MPK3 et la MPK6 pour transmettre le signal en condition de stress salin (Ulm *et al.*, 2002), elle induirait ainsi l'expression de l'antiport Na⁺/H⁺ vacuolaire NHX1 et membranaire SOS1 (Apse *et al.*, 1999 ; Shi *et al.*, 2000). La surexpression du gène *NPK1* (*Nicotiana* protein kinase 1) a induit la tolérance au froid, aux hautes températures et au sel chez le tabac transgénique (Shou *et al.*, 2004).

3.3. Les phosphatases

L'inactivation de la voie MAPK est contrôlée par la déphosphorylation des motifs T-X-Y au moyen de diverses phosphatases, les MAPK phosphatases (MKP) (Doi *et al.*, 1994), les tyrosine phosphatases (Wrugler-Murphy *et al.*, 1994) ou les sérine/thréonine phosphatases (Maeda, 1994). Les sérine/thréonine phosphatases sont classées en quatre groupes en fonction de la nature du substrat, de leur besoin en cations bivalents et de leur sensibilité aux inhibiteurs : les phosphatases de type 1 (PP1), de type 2A (PP2A), de type 2B (PP2B) et de type 2C (PP2C) (Cohen, 1989). Actives sous forme dimérique et nécessitant les ions Mn²⁺ et/ou Mg²⁺, les PP2C possèdent un domaine catalytique conservé et des extrémités N-terminales très variables. La majorité des PP2C isolées sont associées à la transduction du signal ABA. Chez *Arabidopsis* la transcription des gènes *ABI1*, *ABI2* et *AtPP2C-HA* codant pour des phosphatases de type 2C est régulée positivement par l'ABA (Leung *et al.*, (1997) ;

Rodriguez *et al.*, (1998)). L'inactivation du gène *ABI1* chez des mutants d'*Arabidopsis* a révélé son rôle de régulateur négatif de la réponse ABA (Gosti *et al.*, 1999).

4. Les facteurs de transcription

Différentes familles de protéines orchestrent la transduction du signal de stress, du récepteur senseur (en amont) jusqu'aux promoteurs des gènes codant pour les effecteurs de la tolérance (en aval). Parmi ces familles on peut citer les protéines à doigt de zinc, WRKY et Myb. Les transcrits de l'ensemble de ces facteurs de transcription sont fortement exprimés chez les plantes en condition de stress oxydatif (Desikan *et al.*, (2001) ; Pnueli *et al.*, (2003) ; Vranova *et al.*, (2002)).

4.1. Les protéines à doigt de zinc

Chez les eucaryotes, les facteurs de transcription dont le motif de fixation à l'ADN a été le plus étudié et caractérisé sont les protéines à doigt de zinc. Ils sont également appelés de type Cys-2/His-2 ou type TFIIIA. Le motif de fixation est formé d'à peu près 30 acides aminés dont deux paires de cystéine et d'histidine conservées et fixées à un atome de zinc, CX₂-₄CX3FX5L2HX₃₋₅H (Pabo *et al.*, 2001). Les protéines à doigt de zinc jouent le rôle de répresseurs de la transcription des gènes sous-exprimés en condition de stress. Chez *Arabidopsis*, l'expression des gènes codant pour les protéines AZF2 et STZ est induite en réponse à la déshydratation, au stress salin et au traitement exogène par l'ABA. De même, la surexpression du *STZ* a amélioré la tolérance au stress salin chez *Arabidopsis* (Sakamoto *et al.*, 2004) et chez le tabac (Wang *et al.*, 2008) transgéniques.

4.2. Les protéines à doigt de zinc de type WRKY

Les protéines WRKY constituent une large famille de régulateurs de transcription spécifiques aux plantes (Eulgem *et al.*, 2000). Elles sont impliquées dans la régulation de divers processus physiologiques tels la défense contre les pathogènes (Dellagi *et al.*, 2000), la sénescence (Chen *et al.*, 2002), et sont également impliqués dans la réponse à différents stress abiotiques tel que le froid (Huang and Duman, 2002). Toutes les protéines WRKY ont une séquence N-terminale conservée WRKYGQK, et à leur extrémité C-terminale, elles possèdent un domaine dit 'doigt de zinc' comportant deux cystéines et deux histidines qui interagissent

de façon électrostatique avec un atome de zinc (Arrigo, 1999). Le domaine doigt de zinc des WRKY est sensible au statut redox de la cellule et se fixe sur l'ADN au niveau des motifs 'W'. La séquence consensus des motifs 'W' correspond à la séquence (T)(T)TGAC(C/T)) présente au niveau des régions promotrices de plusieurs gènes de défense (Eulgem *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis*, l'expression d'AtWRKY6 est induite lors de la sénescence des feuilles (Robatzek and Somssich, 2001).

4.3. Les protéines Myb

Le premier gène *Myb* caractérisé correspond au protooncogène cellulaire c-myb (myeloblastosis), il est impliqué dans le contrôle de la prolifération et/ou la différenciation des cellules hématopoïétiques (Graf, 1992). Les protéines Myb sont identifiées à leur extrémité N-terminale par un domaine commun correspondant au site de fixation sur l'ADN. Le domaine est formé de trois répétitions imparfaites de 51 à 52 acides aminés, désignées par R1, R2 et R3, contenant chacune trois résidus Trp espacés de 18 à 19 acides aminés (Weston, 1999). Les Myb à deux répétitions R2-R3 sont majoritaires chez les plantes (Jin and Martin 1999) et les résidus Trp y sont remplacés par un acide aminé hydrophobe (Rabinowicz *et al.*, 1999).

Plus d'une centaine de gènes *Myb* ont été caractérisés chez *Arabidopsis* (Stracke *et al.*, 2001) et chez le maïs (Rabinowicz *et al.*, 1999). Les protéines Myb jouent le rôle de médiateurs dans les réponses aux molécules signaux tels que l'acide salicylique et les phytohormones ABA et l'acide gibbérellique (Gubler *et al.*, (1995) ; Urao *et al.*, (1993) ; Yang and Kessig (1996)). La MYB4 est un régulateur négatif de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes chez *Arabidopsis* (Hemm *et al.*, (2001)). Chez l'orge, l'HvMYBGa est activée par l'acide gibbérellique et réduit l'expression de différents gènes durant la germination des graines (Gubler *et al.*, 1995). L'expression du gène OsMYB3R-2 est induite par le froid et les stress hydrique et salin chez le riz. La surexpression de ce gène chez *Arabidopsis* a conféré aux plants transgéniques la tolérance aux trois types de stress (Dai *et al.*, 2007).

5.Activation de l'expression de gènes pour l'adaptation au stress salin

Suite à l'activation des cascades de signalisation et des facteurs de transcription, l'expression de différents gènes va être régulée contribuant à l'adaptation de la plante au stress salin (Figure 5). Ces gènes peuvent coder pour des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des osmoprotecteurs, des protéines chaperonnes, des transporteurs membranaires ou encore pour des enzymes de détoxification.

5.1. Osmoprotection

L'ajustement osmotique chez les plantes supérieures se réfère au maintien de la turgescence par abaissement du potentiel osmotique via l'accumulation de solutés en réponse au déficit hydrique (Guei and Wassom, 1993). Lorsque le potentiel hydrique foliaire décroît, le potentiel de turgescence, la conductance stomatique et l'activité photosynthétique sont maintenus grâce à l'accumulation intracellulaire des solutés. L'ajustement osmotique intervient aussi dans le retardement de la sénescence foliaire et dans l'amélioration de l'extraction de l'eau par les racines (Turner, (1997) ; Turner et al., (2001)).

L'ajustement osmotique se produit via l'absorption et la synthèse de différents osmoprotecteurs par la plante. Dans la partie qui suit nous discuterons de deux acides aminés jouant le rôle d'osmoprotecteurs cellulaires, la glycine-bétaïne et la proline.

5.1.1.La glycine-bétaïne

La glycine-bétaïne (N, N, N-triméthylglycine) est un composé amphotère, électriquement neutre à différents pH physiologiques, extrêmement hydrosoluble mais contient toutefois une moitié non polaire représentée par les trois groupements méthyl. Ses propriétés moléculaires lui permettent d'interagir avec les domaines hydrophiles et hydrophobes des macromolécules comme les enzymes et les complexes protéiques (Sakamoto and Murata, 2002).. En condition de stress, la glycine-bétaïne est considérée comme l'osmoprotecteur le plus efficace, capable d'améliorer la disponibilité en eau (Gabbay-Azaria *et al.*, 1998) et de protéger les enzymes de croissance et de photosynthèse (Sakamoto and Murata, 2002). La glycine-bétaïne protège aussi les membranes du froid (Krall *et al.*, 1989), des hautes températures (Jolivet *et al.*, 1982) et du sel (Jolivet *et al.*, 1983) et prévient la dissociation des polypeptides extrinsèques du photosystème II (PSII) en présence de hautes concentrations de sel (Murata *et al.*, 1992).

D'après Sakamoto and Murata (2002), la glycine-bétaïne est synthétisée selon deux voies : au niveau chloroplastique suite à deux oxydations successives à partir de la choline. La première oxydation de la choline en bétaïne aldéhyde est assurée par la choline monooxygénase (CMO). La bétaïne aldéhyde est à son tour oxydée par la bétaïne aldéhyde déshydrogénase (BADH) pour enfin produire la glycine-bétaïne. Cette voie est privilégiée en situation de stress. En conditions normales, la glycine-bétaïne serait issue de trois méthylations successives de la glycine (Figure 9).

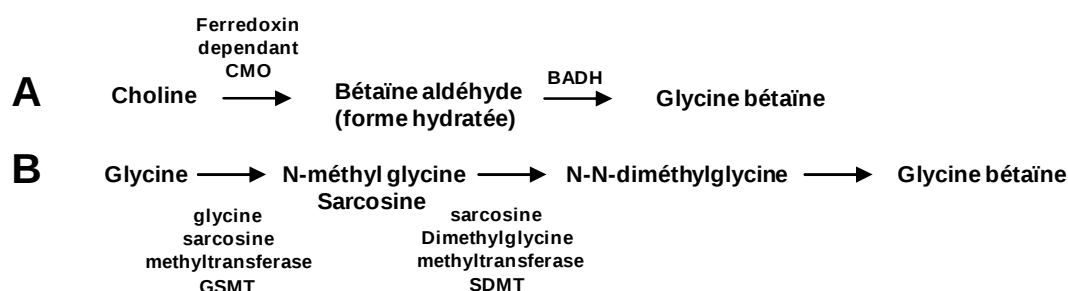


Figure 9. Voies de biosynthèse de la glycine-bétaïne en conditions stressante (A) et normale (B).

Chez les espèces accumulatrices de la glycine-bétaïne tel que la betterave, il a été rapporté une nette accumulation de la glycine-bétaïne et une induction de l'expression du gène *CMO* codant pour la choline monooxygénase en condition de stress salin (Subbarao *et al.*, 2001). Le niveau d'accumulation de la glycine-bétaïne corrèle positivement avec le degré de tolérance des plantes au sel (Saneoka *et al.*, 1995). Les agrumes accumulent de la choline et de la glycine-bétaïne en condition de stress salin (Piqueras *et al.*, 1996). Les espèces non accumulatrices de la glycine-bétaïne telles qu'*Arabidopsis*, le riz, la pomme de terre, le tabac et la tomate ont eux par contre servi de cibles potentielles pour l'ingénierie génétique de la synthèse de la bétaïne (McCue and Hason, 1990). L'amélioration de la tolérance aux stress a été observé chez les espèces surexprimant le gène *COD* (gène codant pour la choline oxydase chez les bactéries), la tolérance au stress salin chez *Arabidopsis* (Hayashi *et al.*, 1998) et chez le tabac (Nuccio *et al.*, 1998), la tolérance au froid (Alia *et al.*, 1998a) et la tolérance aux hautes températures chez *Arabidopsis* (Alia *et al.*, 1998b).

5.1.2. La proline

La proline fait partie des vingt acides aminés du code génétique. En plus d'être un osmoprotecteur, elle joue un rôle important dans la régulation du potentiel redox (Saradhi and Saradhi, 1991). L'accumulation de la proline corrèle avec la tolérance des plantes au stress oxydatif induit par les stress hydrique ou salin (Kishor *et al.*, 1995). En effet la synthèse de la proline est accompagnée d'un renouvellement des stocks de NADP^+ qui intervient dans le maintien du potentiel redox durant le stress. Le NADP^+ joue un rôle majeur dans les mécanismes de défense antioxydante. Un signal provenant des processus de métabolisme et de catabolisme de la proline, probablement le potentiel redox des pools de NADP^+ , contrôlerait l'expression des gènes en réponse au stress osmotique. La proline est impliquée dans la régulation du pH cellulaire (Bellinger and Larher, 1987) afin de protéger et stabiliser les macromolécules en conditions de déficit hydrique ou de hautes forces ioniques (Handa *et al.*, 1986). La proline protège les membranes contre la peroxydation en piégeant les radicaux libres (Alia *et al.*, (2001) ; Smirnoff and Cumbes, (1989)) et constitue lors des levées de stress une source de carbone et d'azote pour la plante (Bellinger and Larher, (1987) ; Hare *et al.*, (1998)). Il existe deux voies alternatives de biosynthèse de la proline chez les plantes supérieures (Figure 10). En condition de stress osmotique, la voie du L-Glutamate est considérée comme la source majeure de la proline (Delauney *et al.*, 1993). La conversion du glutamate en glutamate-5-semi-aldéhyde (GSA) est catalysée par une enzyme bi-fonctionnelle, la delta1-pyrroline-5-carboxylate-synthase (P5CS). La P5CS, par son activité semi aldéhyde glutamique déshydrogénase (GSA-DHG), convertit le GSA en pyrroline-5-carboxylate (P5C) qui, par la suite, est réduite en proline par la P5C Réductase (P5CR). En conditions normales, la production de la proline est assurée par la voie de l'ornithine. La P5C y est obtenue par transamination de l'ornithine sous l'action de l'ornithine oxo-acid transaminase, et est ensuite réduite en proline par la P5CR.

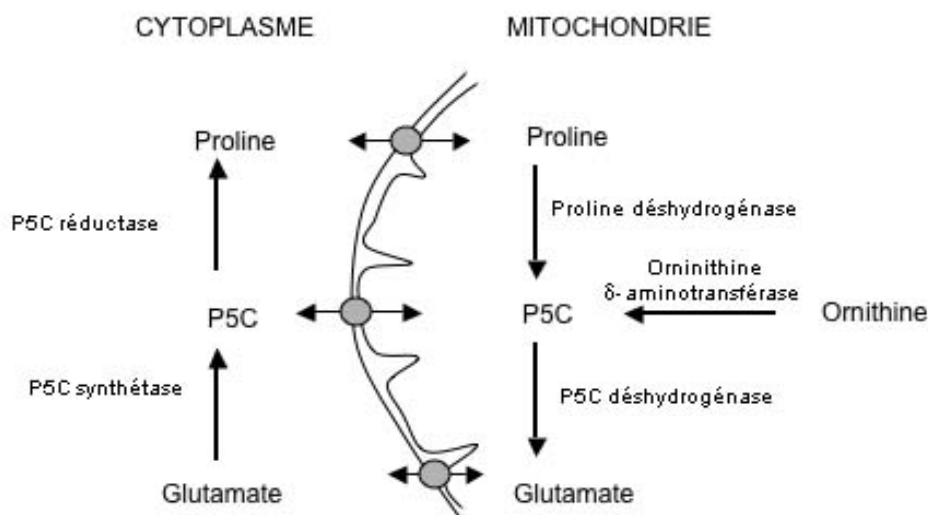


Figure 10. Métabolisme de la proline chez les plantes.

Les agrumes accumulent la proline de manière constitutive et préférentielle au niveau des feuilles (Kato, (1986) ; Maas, (1993) ; Nolte *et al.*, (1997)). Les quantités de proline produites sont augmentées en réponse au stress hydrique (Laborem *et al.*, 1991), au stress salin (Gomez-Cadenas *et al.*, (1998) ; Mademba-Sy *et al.*, (2003) ; Piqueras *et al.*, 1996) et au froid (Purvis and Yelenosky, 1983). D'après Mademba-Sy *et al.*, (2003) une corrélation positive existe entre l'accumulation de proline et le degré de sensibilité au sel chez les agrumes. Les génotypes sensibles au sel tels que le cédratier Etrog et le kumquat Marumi accumulent d'avantage de proline que les génotypes tolérants tels que le mandarinier commun, le clémentinier et l'oranger Shamouti. Chez les agrumes greffés soumis au stress salin, aucune différence n'a pu être relevée entre le niveau de proline accumulé dans les feuilles du porte-greffe et celles du greffon (Purvis and Yelenosky, 1983).

L'expression du gène *P5CS* est régulée positivement par le stress salin (Liu and Zhu, (1997) ; Ueda *et al.*, (2004)) , la déshydratation (Hu *et al.*, 1992), le traitement exogène à l'ABA (Yoshida *et al.*, (1995) ; Xin and Li, (1993)) et le froid (Chen and Li, (2002)). La surexpression du gène *P5CS* a permis le maintien du potentiel osmotique foliaire, de la biomasse racinaire et a conféré la tolérance au stress osmotique chez le tabac (Kishor *et al.*, 1995), et la tolérance au sel et au déficit hydrique chez le riz (Zhu *et al.*, 1998). Chez les agrumes, la surexpression du gène codant pour la P5CS a conféré au porte-greffe citrange Carrizo une meilleure tolérance au déficit hydrique (Molinari *et al.*, 2004). La suppression

antisense de l'enzyme de dégradation de la proline, la proline déshydrogénase, a augmenté la tolérance au froid chez *Arabidopsis* (Nanjo *et al.*, 1999).

L'accumulation des transcrits d'*AtP5CS* induite par le stress salin est régulée chez les mutants déficitaires en l'hormone ABA (*aba*) ou les mutants insensibles à l'ABA. Chez le mutant *aba1-1*, le traitement salin n'induit pas d'augmentation du niveau de transcription des *AtP5CS1* et *AtP5CS2*. L'ABA est donc indispensable comme molécule signal dans l'activation de la synthèse de la proline en condition de stress salin (Temesvariné, 2004).

5.2. Les protéines chaperonnes : Late Embryogenesis Abundant 'LEA'

Les protéines LEA sont des protéines hydrophiles qui ont été découvertes dans les graines du coton durant l'embryogénèse (Dure *et al.*, 1981). Par la suite les LEA ont été retrouvés dans divers organes chez différentes plantes soumises au froid, au déficit hydrique et au stress salin (Ingram and Bartels, (1996) ; Thomashow, (1999)). La présence des LEA a été généralement associée à la tolérance cellulaire à la déshydratation induite par les différents stress environnementaux. Elles seraient impliquées dans la protection de la machinerie cellulaire et dans le maintien des structures membranaires et protéiques (Xu *et al.*, 1996).

La corrélation entre l'expression des gènes codant les LEA ou l'accumulation des protéines LEA et la tolérance aux stress chez différentes plantes signifie leur implication dans la tolérance au stress. L'accumulation de hautes quantités de protéines LEA3 chez différents blés a été corrélée à la tolérance à la déshydratation (Ried and Walker-Simmons, 1993) et celle des protéines LEA2 et LEA3 a été corrélée à la tolérance au stress salin chez différentes variétés de riz (Moons *et al.*, 1995).

Selon Naot *et al.*, (1995), l'expression foliaire du gène *cLEA5* codant pour la protéine cLEA5 chez les agrumes est induite par le stress oxydatif causé par trois types de stress, les stress salin et hydrique et les hautes températures. Parmi les protéines LEA chez les agrumes, la protéine CuCOR19 joue un rôle cryoprotecteur grâce à sa structure secondaire formée majoritairement d'hélices aléatoires, lui conférant les propriétés de fixation de l'eau et de maintien des structures protéiques. L'expression du CuCOR19 est fortement induite par le froid mais est faiblement stimulée par les traitements salin ou à l'ABA (Hara *et al.*, 2001). La transformation du tabac avec le transgène du *Citrus unshiu* lui a conféré la

tolérance au froid (Hara *et al.*, 2003). La surexpression des gènes codant pour les protéines LEA a amélioré la tolérance au stress chez diverses plantes transgéniques. Par exemple la surexpression du gène *HVA1*, codant pour la protéine LEA (HVA1) chez l'orge, a conféré la tolérance au déficit hydrique chez le blé (Sivamani *et al.*, 2000) et chez le riz (Xu *et al.*, 1996).

5.3. La régulation de l'homéostasie ionique

En milieu salin (NaCl), les plantes accumulent les ions Na^+ et Cl^- en fonction de leur capacité de tolérance. L'accumulation de ces ions limite l'absorption des autres ions indispensables pour la croissance de la plante. En effet, le Na^+ entre en compétition avec les ions K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} , tandis que le Cl^- restreint l'influx du NO_3^- , PO_4^{2-} et SO_4^{2-} (Termaat and Munns, 1986). Les perturbations morphologiques et physiologiques produits par la salinité sont souvent associées à l'accumulation des deux ions Na^+ et Cl^- . Le maïs accumule les mêmes quantités de Na^+ et Cl^- (Izzo *et al.*, 1991). Chez le riz, Lessani and Marschner, (1978) ont rapporté une accumulation linéaire des deux ions. Chez les agrumes, l'accumulation des ions Cl^- est plus importante et plus rapide que celle du Na^+ (Romero-Aranda *et al.*, 1998). La capacité des agrumes à tolérer la salinité est clairement liée à la capacité du porte-greffe à exclure les ions Cl^- (Cooper *et al.*, (1952) ; Walker *et al.*, (1983) ; Bañuls *et al.*, (1997) ; Storey and Walker, (1999) ; Romero-Aranda *et al.*, (1998) ; Bañuls and Primo-Millo, (1995) ; Maas, (1993)). Les chloroses foliaires et la défoliation sont directement liées à la toxicité des chlorures chez les agrumes soumis à NaCl (Moya *et al.*, (2003) ; Romero-Aranda *et al.*, (1998) ; Bañuls *et al.*, (1997) ; Bañuls and Primo-Millo, (1995) ; Walker *et al.*, (1982) ; Cooper, (1961)). L'addition d'ions tels que les nitrates et Ca^{2+} dans la solution saline semble améliorer la tolérance au sel chez les agrumes (Iglesias *et al.*, 2004).

Afin de maintenir une croissance continue et limiter les effets toxiques du Na^+ et Cl^- , les plantes développent différents mécanismes leur permettant d'une part de minimiser l'influx des ions à partir du sol et d'autre part de réduire la concentration de ces ions dans le cytoplasme.

5.3.1. Transport de Na⁺

La tolérance au sel chez les plantes dépend des transporteurs responsables de la séquestration du Na⁺ dans les vacuoles (NHX1) (Blumwald and Poole, 1985 et 1987) et des transporteurs d'efflux de Na⁺ (SOS1) (DuPont, (1992) ; Shi *et al.*, (2002)) (Figure 11). L'influx de Na⁺ dans les vacuoles est contrôlé par un gradient de protons généré par les ATPase (H⁺-adenosine triphosphatase) et les PPase (H⁺-pyrophosphatase) du tonoplaste (Blumwald and Poole, (1987) ; Horie and Schroeder, (2004)). Outre son rôle dans la minimisation des dommages de Na⁺ dans le cytosol, la séquestration des ions Na⁺ dans les vacuoles permet l'entrée d'eau dans la cellule et ainsi le maintien de turgescence (Glenn *et al.*, 1999). La surexpression d'*AtNHX1* chez *Arabidopsis* a mis en évidence un phénotype tolérant au sel et a permis une séquestration vacuolaire accrue du Na⁺ (Apse *et al.*, 2003). De même, l'amélioration de la tolérance au sel par surexpression de l'*AtNHX1* a été démontrée chez *Brassica* (Zhang *et al.*, 2001), chez la tomate (Zhang and Blumwald, 2001) et par surexpression d'*OsNHX1* chez le riz (Fukuda *et al.*, 2004). L'induction de l'expression du gène *cNHX1* a été rapportée chez les agrumes en conditions de stress salin et des hautes températures. Le cDNA isolé est un fragment de 2135 pb avec un ORF de 1626 pb, et code pour un polypeptide de 542 acides aminés et de masse moléculaire de 59.8 kDa. La protéine cNHX1 est identique à 83, 78 et 56% avec respectivement les NHX1 d'*Arabidopsis thaliana*, d'*Atriplex gmelini* et du riz (Porat *et al.*, 2004).

Chez les agrumes, la capacité d'exclusion des ions Na⁺ au niveau du greffon va se traduire par un comportement différent en fonction du porte-greffe utilisé (Maas, 1993). Cependant, cette capacité d'exclusion se perd chez certains porte-greffes en présence de hautes concentrations de sel (Zekri, 1993). Les porte-greffes mandarinier Cléopâtre et le bigaradier sont des accumulateurs de Na⁺ (Cooper, (1961) ; Zekri, (1987)). Le *Poncirus trifoliata* est un excluant de Na⁺ (Tozlu *et al.*, 2000).

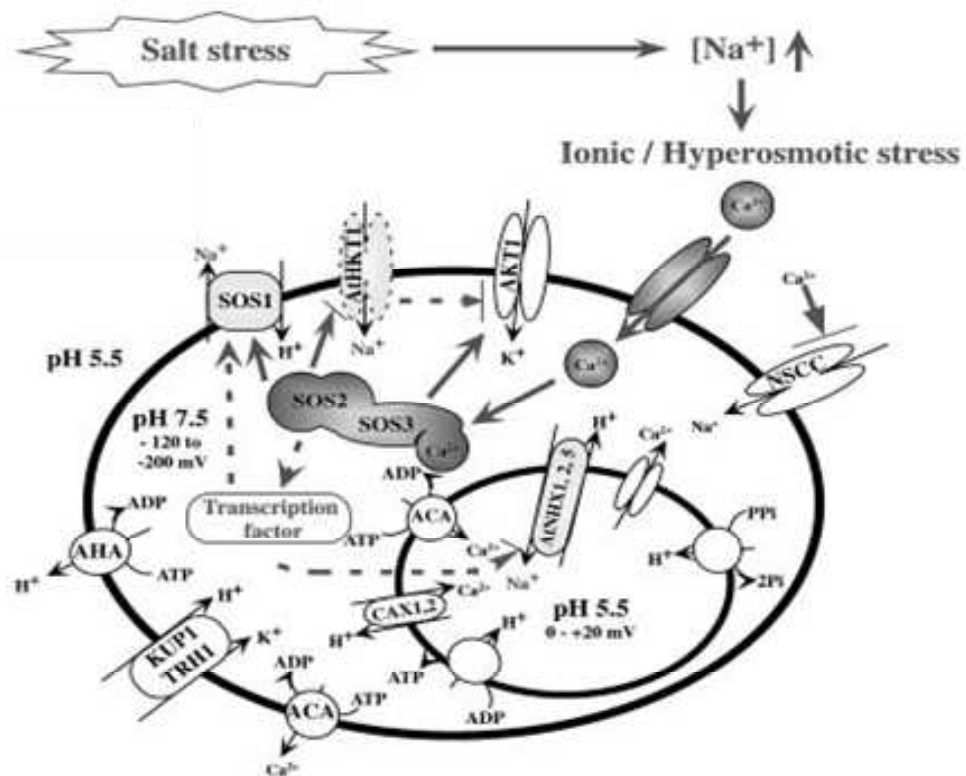


Figure 11. Régulation de l'homéostasie cellulaire du Na^+ en situation de stress salin chez *A. thaliana* d'après Yokoi *et al.* (2002)

5.3.2. Transport de Cl^-

Les canaux de transport de Cl^- contrôlent la composition ionique du cytoplasme et le volume cellulaire. D'après Jentsch *et al.*, (2002), le transport du Cl^- se fait en interaction avec divers canaux ioniques tels que les antiports Na^+/H^+ et $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ et les pompes H^+/ATPase . La régulation du volume cellulaire nécessite l'activation des canaux K^+ et Cl^- pour induire l'efflux des sels et réguler ainsi le pH cytoplasmique. Très peu est connu sur le rôle des canaux Cl^- dans la régulation du transport de Cl^- en conditions salines.

D'après Hechenberger *et al.*, (1996), les canaux Cl^- dépendants du voltage (de type CLC) sont retrouvés chez tous les organismes procaryotes et eucaryotes. Ils sont responsables du transport passif des ions Cl^- sous le contrôle du gradient électrochimique. Chez les animaux, les canaux de type CLC régulent le potentiel membranaire et l'homéostasie du pH cellulaire. Leur inactivation par mutagenèse engendre des maladies telles que les néphropathies (Dutzler, 2004). Chez les plantes, les gènes codant pour les canaux de type CLC ont été tout d'abord

identifiés chez le tabac (Lurin *et al.*, 1996). Chez *Arabidopsis*, 7 gènes codant pour les canaux de type CLC ont été identifiées (*AtCLCa-AtCLCg*) (Hechenberger *et al.*, 1996) et certains des canaux ont été localisés. L'*AtCLCa* jouant le rôle d'antiport NO_3^-/H^+ au niveau du tonoplaste (De Angeli *et al.*, 2006) et les *AtCLCe* et *AtCLCf* localisés respectivement au niveau de la membrane des thylacoïdes chloroplastiques et des vésicules de Golgi (Marmagne *et al.*, 2007).

En situation de stress salin, l'expression d'*OsCLC1* vacuolaire est induite chez le riz tolérant aux ions Cl^- et est réprimée chez le riz (lignée IR29) sensible aux Cl^- (Nakamura *et al.*, (2005) ; Diédhiou and Golldack, (2005)). Ces résultats montrent l'implication du canal *OsCLC1* dans l'homéostasie du Cl^- . Nous ne disposons que de très peu d'informations sur les transporteurs de Cl^- chez les agrumes. Colmenero-Flores *et al.*, (2007) ont identifié et caractérisé récemment un gène codant pour transporteur secondaire de Cl^- qui serait impliqué dans les processus développementaux et dans le transport longue-distance du Cl^- .

5.4. L'homéostasie hydrique : les aquaporines

Une fois absorbée au niveau des cellules de l'épiderme des racines, l'eau doit traverser des séries de couches cellulaires incluant l'épiderme, les cellules du cortex, l'endoderme, le péricycle, les cellules parenchymateuses et les vaisseaux (Steudle and Peterson, 1998). Que ce soit au niveau racinaire ou au niveau des autres organes de la plante, l'eau est transportée dans les tissus suivant trois voies : à travers les parois cellulaires (voie apoplastique) ou de cellule en cellule via des ponts cytoplasmiques dits plasmodesmes (voie symplastique) ou à travers les membranes (voie transcellulaire) (Javot and Maurel, 2002). Les aquaporines régulent la conductivité hydraulique des membranes où elles sont intégrées et peuvent augmenter de dix à vingt fois leur coefficient de perméabilité de l'eau (Pf). Les aquaporines spécifiques du transport d'eau peuvent transporter jusqu'à un milliard de molécules d'eau par seconde et par sous-unité, en fonction du gradient osmotique qui leur est imposé (Chaumont *et al.*, 2001).

Les aquaporines sont des protéines membranaires de faible masse moléculaire (24-30 kDa) appartenant à la famille des protéines membranaires intrinsèques (MIP) (Agre *et al.*, 1998). En se basant sur l'homologie de leurs séquences, les MIP ont été classés en quatre groupes. Les Protéines Intrinsèques de la membrane Plasmique, PIP ; les Protéines Intrinsèques

tonoplastiques, TIP ; les Protéines Intrinsèques ressemblant à la Noduline 26, NIP, et enfin les SIP (Small Intrinsic Proteins) (Johnson *et al.*, (1990) ; Daniels *et al.*, (1994) ; Weig *et al.*, (1997) ; Johanson *et al.*, (2001)). Les NIP et les SIP ont fait l'objet de peu d'études, toutefois leur localisation dans la plante et leur compartimentation dans la cellule sont connues. La NIP NOD26 a été localisée au niveau des membranes pér bactéroides des nodules racinaires chez le soja (Fortin *et al.*, 1987). En ce qui concerne les SIP, elles ont été localisées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique chez *Arabidopsis* et seraient impliquées dans le transport de l'eau et d'autres petites molécules ou des ions (Ishikawa *et al.*, 2005).

Les aquaporines ont une structure commune composée de six domaines membranaires liés par trois boucles extracellulaires et deux intracellulaires. Les extrémités N- et C-terminales des aquaporines baignent dans le cytosol (Fujiyoshi *et al.*, 2002). Les aquaporines sont actives sous la forme de tétramère et chaque monomère forme un pore indépendant. Un très grand nombre d'isoformes d'aquaporines ont été rapportés chez les plantes. En effet les gènes codant pour les aquaporines sont au nombre de 35 chez *Arabidopsis* (Quigley *et al.*, 2001 ; Johanson *et al.*, 2001), de 31 chez le maïs (Chaumont *et al.*, 2001) et de 33 chez le riz (Sakurai *et al.*, 2005). La diversité des aquaporines est attribuée au grand degré de leur compartimentation dans la cellule et leur implication dans le contrôle du transport de l'eau pour l'adaptation aux changements environnementaux (Johanson *et al.*, 2001).

La majorité des aquaporines sont exprimés dans les racines et les parties aériennes de la plante à l'exception de quelques unes telles que la NOD26 qui n'est exprimée qu'au niveau racinaire (Fortin *et al.*, 1987). En plus de leur rôle dans le transport de l'eau chez les plantes, certaines aquaporines faciliteraient le transport des gaz tels que le CO₂ (Prasad *et al.*, (1998) ; Flexas *et al.*, (2006) ; Katsuhara and Hanba, (2008)), NH₃ et NH₄⁺ à travers les membranes (Holm *et al.*, (2005) ; Loque *et al.*, (2005)) et le H₂O₂ (Bienert *et al.*, 2007). La réponse des MIP a été décrite chez les plantes soumises à différents stress tels que la sécheresse, les basses températures, le stress salin, la lumière, les pathogènes ou encore aux stimuli hormonaux. Les gènes, codant pour différentes aquaporines, sous-exprimés ou surexprimés en condition de stress hydrique ou salin ont été décrits chez *Arabidopsis*, le riz, le tournesol, le chou-fleur, le blé, l'orge, et le maïs (Kawasaki *et al.*, (2001) ; Seki *et al.*, (2002) ; Maathuis *et al.*, (2003) ; Martinez-Ballesta *et al.*, (2003) ; Wang *et al.*, (2003b) ; Jang *et al.*, (2004)). L'expression des gènes codant pour les MIP est régulée par l'ABA chez *Arabidopsis*, l'orge, le radis, la tomate, *Brassica napus* et *Craterostigma plantagineum* (Fray *et al.*, (1994) ; Mariaux *et al.*, (1998) ; Gao *et al.*, (1999) ; Hoth *et al.*, (2002) ; Seki *et al.*, (2002) ; Suga *et al.*, (2002)). Hose *et al.*,

(2000) ont remarqué que l'ABA augmentait la conductivité de l'eau au niveau racinaire et sa perméabilité au niveau des cellules du cortex chez le maïs.

La famille des PIP est formée de deux groupes de protéines PIP1 et PIP2 différenciées par la longueur de leurs extrémités N- et C-terminales. Les PIP2 ont une plus courte extension N-terminale que les PIP1 et une plus longue extension C-terminale comprenant des sites de phosphorylation (Schäffner, (1998) ; Chaumont *et al.*, (2000) ; Johansson *et al.*, (2000)). Parmi les 35 gènes codant pour les MIP chez *Arabidopsis*, 13 sont homologues aux PIP (Jang *et al.*, 2004). L'expression des PIP est régulée négativement par le stress salin et osmotique tel que chez l'orge (Katsuhara *et al.*, 2002), chez *Arabidopsis* (Jang *et al.*, 2004) et chez le maïs (Zhu *et al.*, 2005). La régulation de l'expression des gènes d'aquaporines serait une manière pour la plante de réduire la perte d'eau à partir des cellules, de diminuer l'entrée d'eau dans les cellules et/ou réduire les flux d'eau à travers les tissus. L'ABA serait impliquée dans la régulation de l'expression des PIP chez le maïs (Zhu *et al.*, 2005), chez *Arabidopsis* (Jang *et al.*, 2004) et chez le radis (Suga *et al.*, 2002).

Les études sur les mutants PIP-antisens chez *Arabidopsis* ont permis de mettre en évidence la nécessité des deux aquaporines PIP lors de la récupération d'un stress hydrique (Martre *et al.*, 2002). La surexpression des protéines PIP n'a aucunement amélioré la tolérance au sel chez les plantes transgéniques. La surexpression de l'*AtPIP1b* chez le tabac a amélioré la vigueur des plantes transgéniques dans des conditions de croissance normales, par contre n'a eu aucun effet en condition de stress salin et a eu des effets néfastes en condition de stress hydrique (Aharon *et al.*, 2003). La surexpression de la PIP2 de l'orge (HvPIP2) a amélioré la conductance et l'assimilation du CO₂ (Hanba *et al.*, 2004) en conditions normales et a amélioré la tolérance au sel (Katsuhara *et al.*, 2003) chez le riz.

5.5. La détoxication antioxydante

La production des ROS est régulée par un système de détoxication qui maintient l'équilibre entre leur production et leur destruction. En condition de stress, cet équilibre est rompu et il en résulte une production massive d'ROS. Les ROS sont capables d'activer des endonucléases qui peuvent endommager l'ADN (Hagar *et al.*, 1996). Les radicaux hydroxyle augmentent la susceptibilité des protéines cellulaires aux attaques protéolytiques (Casano *et al.*, 1994) et la peroxydation des lipides.

Deux différents mécanismes de détoxication sont mis en place par la cellule. Le premier système de détoxication est composé de molécules antioxydantes telles que l'ascorbate et le glutathion et le deuxième système comprend lui différentes enzymes de piégeage des ROS, la catalase CAT, la superoxyde dismutase SOD, l'ascorbate peroxydase APX, la glutathion peroxydase GPX et la glutathion reductase GR.

5.5.1.L'acide ascorbique et l'Ascorbate peroxydase

L'acide ascorbique avec le glutathion sont considérés comme les antioxydants majeurs capables de tamponner le potentiel redox dans la cellule, ils interviennent dans la croissance, le développement et dans les réponses aux stress (Smirnoff, (2000) ; Pastori *et al.*, (2003) ; Mittova *et al.*, (2004)). L'acide ascorbique est présent dans les chloroplastes, le cytosol, la vacuole et l'espace apoplastique des cellules foliaires (Foyer *et al.*, (1991) ; Polle *et al.*, (1990)). L'oxydation de l'ascorbate a lieu en deux étapes, la première étape catalysée par l'ascorbate peroxydase (APx) permet l'élimination d'une molécule de H_2O_2 et produit le mono-dehydro-ascorbate (MDA). L'ascorbate est utilisé comme premier substrat de la voie cyclique de détoxication enzymatique du peroxyde d'hydrogène (Dalton *et al.*, 1986) (Figure 12). Le MDA produit suit deux voies : une partie est réduite par la MDA reductase pour la régénération de l'ascorbate et l'autre partie rejoint le cycle ascorbate-glutathion GSH permettant la régénération du glutathion sous sa forme réduite. L'ensemble des enzymes impliquées dans la régénération de l'ascorbate sont disponibles au niveau du chloroplaste (McKersie, 1996).

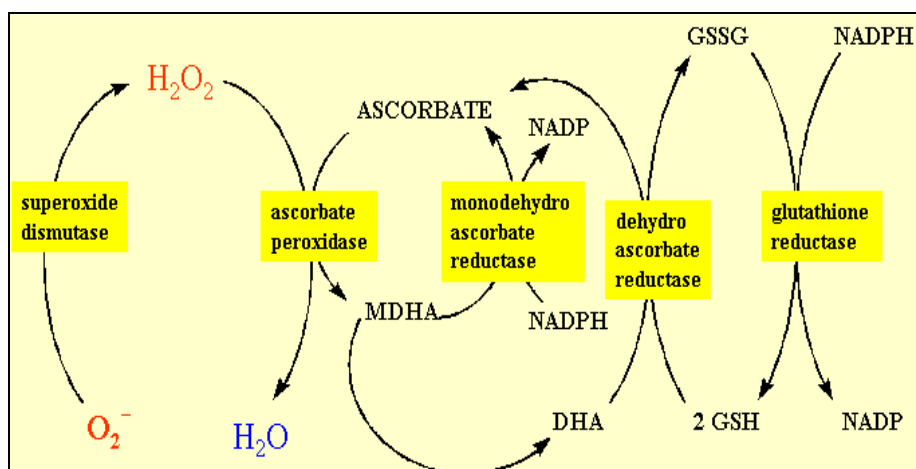


Figure 12. Cycle ascorbate-glutathion d'Asada-Halliwell : la voie de piégeage du H_2O_2 et de régénération de l'ascorbate.

L'ascorbate peroxydase (APx) est l'enzyme responsable de l'élimination du H₂O₂ chez les plantes en condition de stress oxydatif. On la retrouve chez les plantes supérieures, les algues et plusieurs cyanobactéries (Gamble and Burke, 1984). Chez les plantes supérieures, l'activité de l'APx est localisée à la fois au niveau des chloroplastes (chAPx) et du cytosol (cytAPx) (Chen and Asada, (1989) ; Tanaka *et al.*, (1991)). La chAPx est divisée selon sa localisation en deux isoformes: l'APx du stroma (sAPx) et l'APx thylakoïdale (tAPx) (Miyake and Asada, (1992) ; Miyake *et al.*, (1993)). La tAPx élimine le H₂O₂ généré lorsque la chaîne de transfert d'électrons est surchargée au niveau des thylakoïdes (Miyake and Asada, 1992). La chAPx et la cytAPx partagent plusieurs propriétés moléculaires mais elles diffèrent les unes des autres par plusieurs caractéristiques. Comparée à la cytAPx, l'activité de la chAPx est rapidement inactivée dans un milieu pauvre en ascorbate et est plus sensible aux thiols et aux inhibiteurs (Nakano and Asada, (1981) ; Chen and Asada, (1989)). Dans les chloroplastes, l'ascorbate peroxydase réduit le H₂O₂ en H₂O en utilisant l'acide ascorbique comme donneur d'électrons selon la réaction :



L'activité de l'APx est augmentée en réponse à plusieurs types de stress (Tanaka *et al.*, (1985) ; Gillhan and Dodge, (1986) ; Smirnoff and Gressel, (1988)). Chez le riz en condition de stress salin, l'expression du gène codant pour la cytAPx (OsAPx8) est induite au niveau racinaire alors qu'OsAPx1, OsAPx2 (cytosoliques), OsAPx3, OsAPx4 (peroxisomales), OsAPx5, OsAPx6 et OsAPx7 (chloroplastiques) ne le sont pas (Hong *et al.*, 2007). La surexpression du gène *APX* chez *Arabidopsis* a montré une amélioration de la tolérance aux hautes températures (Shi *et al.*, 2001).

5.5.2. Le glutathion et la glutathion réductase (GR)

Le glutathion, glutamyl cysteinyl glycine (GSH) est le plus petit composé thiol chez les plantes (Kunert and Foyer, (1993) ; Foyer *et al.*, (1997)). En plus de son rôle dans la détoxification cellulaire des ROS (^{1/2}O et hydroxyle), d'autres rôles lui ont été attribués dans divers autres processus physiologiques tels que la signalisation du stress (Wingate *et al.*, (1988) ; Foyer *et al.*, (1997)), la détoxification des produits de peroxydation de lipides (Mullineaux *et al.*, 1998) et la stabilisation des enzymes nécessitant un groupement thiol réduit pour leur activité (Foyer *et al.*, 1997). Il joue un rôle très important dans la régénération

de l'ascorbate à partir du dehydro-ascorbate (DHA) sous l'action de la DHA reductase (DHAR). Pendant la régénération de l'ascorbate, le glutathion GSH est oxydé en glutathion disulfide (GSSG), il est ensuite régénéré par la glutathion reductase (GR) (Figure 12). L'enzyme GR a été retrouvée dans les fractions chloroplastiques, mitochondriales et cytosoliques chez le petit-pois (Hernandez *et al.*, 2000) et chez le haricot *Vigna unguiculata* (Hernandez *et al.*, 1994) soumis au stress salin.

La glutathion réductase (GR) joue un rôle essentiel dans la protection des chloroplastes contre le dommage oxydatif tout en maintenant un rapport GSH/GSSG élevé (Gamble and Burke, 1984). Dans les chloroplastes, lorsque la chaîne de transport d'électron est surchargée, le cycle de Haliwell-Ashada (cycle ascorbate-glutathion) est activé (Figure 12). Dans ce cycle, l'activité de la GR n'est qu'un maillon de la chaîne de réaction, mais constitue selon Tanaka *et al.*, (1985) une étape limitante dans la réduction du GSSG (glutathion oxydé) par le NADPH. Il est donc possible que l'activité de la GR dicte, dans une certaine mesure, la tolérance des plantes aux stress oxydatifs (Tanaka *et al.*, 1988). Cette hypothèse est appuyée par les résultats de Tanaka *et al.*, (1990) et Davenport *et al.*, (2004), qui ont observé respectivement chez le tabac et le tournesol, une tolérance plus élevée au stress chez les cultivars ayant une plus forte activité de la GR. Les génotypes tolérants au froid chez la tomate, le maïs et le blé accumulent le GSH en condition de froid et ont une activité constitutive de la GR par rapport aux génotypes sensibles (Walker and McKersie, (1993) ; Kocsy *et al.*, (1996, 1997 et 2000), suggérant l'implication du GSH et de GR dans l'amélioration de la tolérance au stress. La surexpression du gène codant pour la dehydroascorbate reductase DHAR chez *Arabidopsis* lui a conféré la tolérance au stress salin (Ushimaru *et al.*, 2006)

5.5.3.La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD a été tout d'abord isolée par Mann and Kleilin en 1938 qui lui ont attribué le rôle d'une protéine impliquée dans le stockage du cuivre. Ensuite, la SOD a été nommée indophénol oxydase ou encore tétrazolum oxydase jusqu'à la découverte de sa fonction catalytique par McCord and Fridovitch, (1969). La SOD catalyse la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène chez tous les organismes aérobies et au niveau de l'ensemble des compartiments subcellulaires générateurs d'ROS. Elle joue un rôle central dans la défense contre le stress oxydatif (Beyer *et al.*, (1991) ; Bowler *et al.*, (1992) ;

Scandalios, (1993)). Il existe 3 types de SOD qui ont été classées sur la base de leur co-facteur métallique : les isozymes Cuivre/Zinc (Cu/Zn - SOD), manganèse (Mn-SOD) et Fer (Fe-SOD) (Bannister *et al.*, 1987). La Mn-SOD agit au niveau des mitochondries des cellules eucaryotes, certains isozymes Cu/Zn-SOD agissent au niveau cytosolique et d'autres dans les chloroplastes des plantes supérieures. Ces trois isozymes (Mn/Cu/Zn-SOD) ont été aussi localisées au niveau des peroxisomes et des glyoxysomes chez le melon (*Citrullus vulgaris*) (Sandalio and Del Rio, 1988). Kliebenstein *et al.*, (1998) ont rapporté la présence de trois Fe-SOD chloroplastiques chez *Arabidopsis*. Toutes les formes de la SOD sont codées par le génome nucléaire et sont ensuite transférées vers leurs compartiments respectifs (Bowler *et al.*, 1992). Chez le petit pois en situation de stress salin, il a été rapporté l'augmentation de l'activité des SOD et particulièrement celle de la Fe-SOD et de la Mn-SOD et la réduction de l'activité de la Cu/Zn-SOD II (Hernandez *et al.*, (1993) ; Hernandez *et al.*, (1995) ; Gomez *et al.*, (1999)). L'accumulation de la SOD a été observée chez les agrumes soumis au stress salin (Ferreira *et al.*, (2004) ; Gueta-Dahan *et al.*, (1997)).

Les pommes de terre transformées avec les transgènes *Cu-* et *Zn-SOD* de la tomate (Perl *et al.*, 1993) et le tabac transformé avec les transgènes chloroplastiques de la *Mn-SOD* (Slooten *et al.*, 1995) et la *Fe-SOD* (Van Camp *et al.*, 1996) ont montré une tolérance accrue au stress oxydatif.

5.5.4. La catalase (CAT)

La catalase est une enzyme à hème qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en O₂. La CAT se trouve chez tous les eucaryotes aérobies et est impliquée dans la destruction du H₂O₂ produit dans les peroxysomes via les oxydases lors de la β -oxydation des acides gras et lors de la photorespiration. De multiples formes de catalases ont été isolées chez plusieurs plantes. Le maïs en possède trois isoformes CAT-1, CAT-2 et CAT-3. Les gènes codant pour les trois catalases sont situés sur des chromosomes différents et sont différemment exprimés et indépendamment régulés (Scandalios, 1990). CAT-1 et CAT-2 ont été localisées au niveau des peroxisomes et du cytosol, alors que la CAT-3 est mitochondrial. Les conditions de stress telles que la salinité, les hautes températures ou le froid réduisent l'activité de la catalase (Hertwig *et al.*, (1992) ; Feierabend *et al.*, (1992)). L'expression des trois gènes codant pour la catalase en réponse à différents stress semble dépendre de la lumière chez le radis, la CAT1 s'exprimant et s'accumulant en présence de lumière et la

CAT2 et CAT3 à l'obscurité (Kwon *et al.*, 2007). Les mutants d'*Arabidopsis* n'exprimant pas la catalase exhibe un retardement du développement et une haute sensibilité aux longues expositions à la lumière (Vandenabeele *et al.*, 2004).

L'accumulation de la CAT a été observée chez les agrumes soumis au stress salin, cette accumulation tend à diminuer quand la concentration de la solution saline (NaCl) dépasse 150 mM (Ferreira *et al.*, 2004).

VI. La polyplœdie et son impact chez les plantes

1. La polyplœdie

La polyplœdie est définie comme étant l'augmentation du nombre de chromosomes au delà du lot diploïde ($2n$). Elle peut être la conséquence de la non-disjonction des chromosomes homologues durant la mitose ou la méiose comme elle peut se produire suite à une division normale de chromosomes en mitose ou en méiose, sans cytokinèse ultérieure. Des polyplœides peuvent également être produits en laboratoire en utilisant de la colchicine qui empêche la formation des microtubules et donc la séparation des chromosomes en mitose.

Lorsque la polyplœdie provient du dédoublement du nombre de chromosomes on parle d'autopolyploïdie. Les autopolyploïdes possèdent presque des génomes identiques et sont issus d'hybridation intraspécifique (auto-pollinisation avec des gamètes diploïdes ($2n$)) ou de dédoublement somatique des chromosomes. L'allopolyplœdie est un type de polyplœdie issue de croisement entre deux différentes espèces produisant un hybride interspécifique. Les allopolyplœides possèdent alors deux génomes différents. Les allo- et autopolyploïdes sont traditionnellement différenciés selon le mode d'appariement et d'héritabilité chromosomique, les autopolyploïdes étant à appariement multivalent et à héritabilité polysomique et les allopolyplœides à appariement bivalent et héritabilité disomique (Stupar *et al.*, 2007).

2. La polyplœdie chez les plantes

La polyplœdisation est un phénomène qui a été constaté chez les levures (Wolf and Shield 1997), les invertébrés (Foighil and Thioriot-Quievreux 1999) et les vertébrés (McLysaght

2002). Chez les plantes, les statistiques ont montré que 2 à 4% des événements de spéciation chez les angiospermes impliquent le phénomène de polyploïdisation, ce qui permet d'associer la duplication du génome à la diversification des espèces (Otto and Whitton, 2000). L'estimation de la fréquence des polyploïdes au sein des angiospermes est d'environ 70% (Masterson, 1994). La non-ségrégation des chromosomes peut produire des séries de polyploïdes tel que le cas de la *Cardamine pratensis* L., $2n = 16, 24, 28, 30, 33 \text{ à } 38, 40 \text{ à } 46, 48, 52 \text{ à } 64 \text{ et } 67 \text{ à } 96$ (Lihova *et al.*, 2003). La plasticité du génome des angiospermes et leur capacité à tolérer l'impact de la polyploïdie sur le génome sont remarquables (Leitch and Leitch, 2008).

La stabilisation des allopolyploïdes implique deux événements majeurs. Le premier événement correspond à la diploïdisation cytologique ou chromosomique lors desquelles l'appariement méiotique des chromosomes homéologues est supprimé ce qui conduit à un profil d'appariement similaire aux diploïdes. Le deuxième événement est la diploïdisation génétique lors de laquelle les gènes dupliqués sont soit inactivés soit sous-exprimés (Feldman *et al.*, 1997). Le succès de survie des espèces polyploïdes est probablement lié à l'augmentation de l'hétérozygotie et de la flexibilité due à la présence d'allèles additionnels (Allard *et al.*, 1993).

3.Impacts de la polyploïdie chez les plantes

3.1.Impact phénotypique

La taille des cellules et l'épaisseur des organes (spécialement celle des feuilles) est en corrélation positive avec le niveau de ploïdie des plantes (Stupar *et al.*, 2007). La taille des cellules de garde stomatiques tend à augmenter avec la ploïdie (Masterson, 1994). Plusieurs traits phénotypiques varient entre les polyploïdes et leurs géniteurs diploïdes. Parmi ces traits on peut citer les traits de reproduction tels que la durée et l'initiation de la floraison, la fertilité, l'auto-compatibilité, l'apomixie, la germination et la taille des organes (Jackson, (1976) ; Lewis, (1980) ; Lumaret, (1988) ; Segraves and thompson, (1999) ; Cook and Soltis, (2000) ; Schranz and Osborn, (2000)) et les traits végétatifs tels que la croissance et la tolérance à la sécheresse, comme aussi la susceptibilité aux attaques d'insectes et de champignons (Jackson, (1976) ; Lewis, (1980) ; Lumaret, (1988)).

3.2.Impact génomique

Très peu d'études ont été consacrées aux conséquences de l'autopolyploïdisation sur le génome (Wang *et al.*, (2006) ; Storchova *et al.*, (2006)). L'activation et l'inactivation des gènes et d'autres changements génomiques ont été détectés chez les polyplloïdes néo-synthétisés chez *Brassica* (Song *et al.*, 1995), chez le blé (Feldman *et al.*, 1997), chez la pomme de terre (Stupar *et al.*, 2007), chez *Arabidopsis* (Comai *et al.*, 2000) et chez le coton (Zhao *et al.*, 1998). Durant l'allopolyploïdisation différents changements peuvent se produire, incluant les réarrangements chromosomiques et les changements dans l'expression des gènes. La polyploïdie peut aussi induire des pertes de gènes (Song *et al.*, 1995 ; Pires *et al.*, 2004 ; Pontes *et al.*, 2004), des translocations des séquences répétées de l'ARN ribosomal (Wendel *et al.*, 1995), l'expression inégale des gènes dupliqués homologues ou l'inactivation de l'une des copies (Lee and Chen, (2001) ; Udall and Wendel, (2006)), et les changements de méthylation de l'ADN (Salmon *et al.*, (2005) ; Lukens *et al.*, (2006)). Selon Adams *et al.*, (2004), les gènes homologues chez les allopolyploïdes peuvent s'exprimer différemment selon l'organe de la plante.

Une étude d'expression par puces à ADN chez des allopolyploïdes d'*Arabidopsis* a montré une surexpression des gènes impliqués dans la régulation hormonale et en particulier ceux de la voie de biosynthèse de l'éthylène, dans la défense cellulaire et dans la sénescence tels que les Heat Shock Proteins (Wang *et al.*, 2006). Chez des allopolyploïdes de coton l'expression des gènes codant pour des facteurs de transcription tels que les Myb et WRKY et pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation phytohormonale tels que l'auxine, l'acide gibbérelle, l'ABA et l'éthylène a été fortement activée (Yang *et al.*, 2006).

Différents mécanismes moléculaires sont sollicités dans l'inactivation, la sous-expression, la surexpression des gènes homologues chez les polyplloïdes. L'hyper-méthylation des cytosines a été responsable de l'inactivation de gènes homologues chez les polyplloïdes chez *Arabidopsis* (Lee and Chen 2001). En utilisant un inhibiteur de méthyltransférase ou par inactivation du gène codant pour la méthyltransférase avec un ARN interférant (RNAi) il est facile de réactiver les gènes inactivés. L'activation des rétrotransposons par l'allotétraploïdie chez le blé a induit l'inactivation de plusieurs gènes (Kashkush *et al.*, 2003). De même des modifications d'histones suite à des déméthylations et acétylations ont induit chez des

allopolyploïdes d'*Arabidopsis* l'activation de la copie du gène FLC (Flowering Locus C) du parent *Arabidopsis thaliana*. Le gène FLC est impliqué dans la régulation de la période de floraison, il régule négativement la floraison (Wang *et al.*, 2006).

4.Impact de la polyploïdie chez les agrumes

Chez tous les agrumes et genres apparentés, le nombre chromosomique de base est $n=9$ (Krug, 1943). Les agrumes sont majoritairement diploïdes ($2n=2x=18$) sauf quelques exceptions dont les plus connus sont la lime de Tahiti triploïde, le kumquat Hong Kong (Longley, 1925) et la lime triphasia desert (Esen and Soost, 1972) tétraploïdes. Les triploïdes sont issus de l'hybridation entre deux diploïdes, l'un d'eux fournit le gamète femelle non réduit ($2n$) et l'autre le gamète mâle haploïde (n). Les tétraploïdes sont issus du dédoublement du lot chromosomique des tissus nucellaires et sont présents à une fréquence allant de 1 à 10 % dans les semis de graines polyembryonnées. A l'opposé des triploïdes qui présentent des qualités en tant que variétés tels que l'aspermie, les tétraploïdes eux peuvent avoir des qualités très recherchées en tant que porte-greffe. En effet, ils sont résistants aux contraintes biotiques et abiotiques (Syvertsen *et al.*, (2000) ; Saleh *et al.*, (2008)).

Les tétraploïdes d'agrumes sont caractérisés par une croissance plus lente, des feuilles plus larges, plus épaisses et plus sombres, une peau de fruit plus épaisse et par la présence de moins de jus et de plus de glandes à huile comparé à leur diploïdes respectifs (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996). De même, l'augmentation de la taille des stomates, de l'épaisseur des feuilles, de la concentration cellulaire en chlorophylle et la diminution de la densité stomatique ont rapportées chez les agrumes tétraploïdes (Romero-Aranda *et al.*, (1997) ; de Carvalho Costa *et al.*, 2004). Barrett (1992) a observé la réduction de la taille des arbres, l'augmentation du calibre des fruits et de la tolérance à la sécheresse chez certains agrumes tétraploïdes.

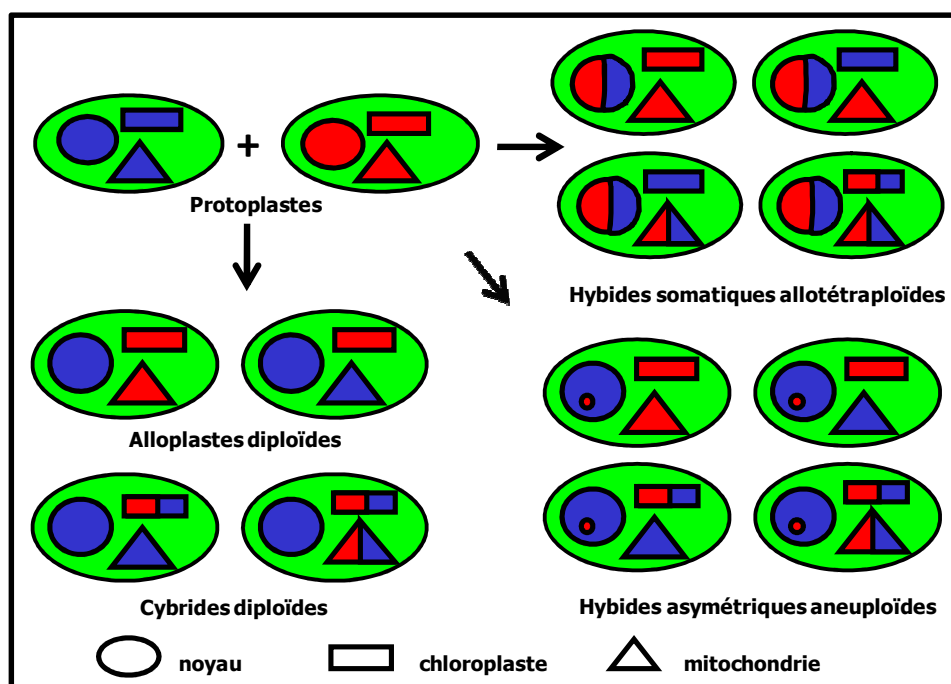
5.Amélioration de la tolérance des agrumes aux stress via l'hybridation somatique

L'hybridation somatique consiste à fusionner des protoplastes (cellules végétales dépourvues de parois pectocellulosiques) obtenus après digestion enzymatique soit de cals embryogènes soit de feuilles. Cette fusion peut se faire entre des protoplastes originaires de deux cals différents ou entre des protoplastes de cal et de feuille par électrofusion ou fusion

chimique. Soumis à un champ électrique induisant leur polarisation dans un milieu de faible conductivité, les protoplastes s'alignent formant des files. Des impulsions de courant continu de forte intensité sont ensuite appliquées afin de désorganiser momentanément les membranes et permettre ainsi l'échange du matériel génétique (Ducieux *et al.*, 1988).

L'hybridation somatique permet l'accroissement de la diversité des pools géniques des espèces cultivées avec la possibilité de réaliser des hybridations interspécifiques et intergénériques. Sans être confrontée aux incompatibilités rencontrées lors des hybridations sexuelles, cette méthode autorise des hybridations entre des parents sexuellement incompatibles. Chez les agrumes, l'hybridation somatique a permis l'élargissement du pool des géniteurs tétraploïdes utilisés pour l'obtention de triploïdes aspermes (de Rocca Serra et Ollitrault, 1992) et pour l'amélioration de la résistance des porte-greffe aux facteurs biotiques et abiotiques.

La fusion des protoplastes peut produire différents modèles d'associations nucléocytoplasmiques. D'après Ollitrault *et al.*, (2000), quatre produits sont réalisables : les hybrides somatiques allotétraploïdes, les alloplastes diploïdes, les cybrides diploïdes et les hybrides asymétriques aneuploïdes (Figure 13).



(D'après Ollitrault *et al.*, 2000)

Figure 13. Les différents produits de l'hybridation somatique.

Les hybrides somatiques possèdent la somme des génomes nucléaires des deux parents et différentes possibilités de combinaisons nucléo-cytoplasmiques. Les cybrides renferment un des deux génomes nucléaires parentaux et des génomes cytoplasmiques recombines. De même les alloplastes contiennent un des génomes nucléaires parentaux mais aucune recombinaison ne touche leurs génomes cytoplasmiques, le produit de fusion n'hérite que l'un des génomes chloroplastiques et mitochondriaux parentaux.

VII.Présentation des travaux de thèse

Mon travail a eu pour but de mettre en évidence les déterminants physiologiques et moléculaires impliqués dans la tolérance au stress salin des porte-greffe d'agrumes polyploïdes. Pour cela, nous avons choisi de comparer la réponse au stress salin de porte-greffe diploïdes [(*Poncirus trifoliata* cv. Pomeroy et le mandarinier commun (*Citrus deliciosa* cv. Willow leaf)], avec celles de leurs autotétraploïdes respectifs et de leur hybride somatique allotétraploïde FLHORAG1 obtenu par fusion de protoplastes. Le *Poncirus* Pomeroy est le porte-greffe d'agrumes le plus sensible au sel tandis que le mandarinier commun est une variété tolérante au sel. Ce contraste de tolérance au sel devait nous permettre de mieux comprendre les déterminismes physiologiques et moléculaires de la tolérance au sel chez les agrumes. Le choix d'inclure des génotypes tétraploïdes dans notre étude avait pour but de comparer l'effet de l'auto- et de l'allopolypléidisation (FLHORAG1) sur la physiologie et sur l'expression de gènes candidats de la tolérance au sel.

Dans une première partie, je me suis intéressée à l'étude du comportement de ces différents génotypes de porte-greffe francs de pied, en situation de stress salin modéré. L'anatomie et la morphologie des feuilles des différents génotypes ont tout d'abord été étudiées. Dans un second temps, l'accumulation des ions chlorures et sodium au niveau foliaire a été caractérisée. Au moyen de la technique de cDNA-AFLP, différents gènes potentiellement impliqués dans la tolérance au sel ont été identifiés. Enfin, l'analyse des profils d'expression de ces gènes aux niveaux diploïde, autotétraploïde et allotétraploïde a été réalisée (article 1).

Dans une seconde partie, j'ai voulu confronter les résultats obtenus précédemment à une nouvelle expérience de forte contrainte saline. Les conditions de stress appliquées avaient pour but de s'affranchir autant que possible de la composante hydrique du stress salin. Une étude physiologique de la tolérance au sel des différents génotypes a été réalisée. Celle-ci a été couplée à une étude de l'expression de gènes candidats par PCR en temps réel pour les différents génotypes (article 2).

Dans une troisième partie de la thèse, je me suis intéressée à l'étude des porte-greffe polyploïdes greffés avec du cédratier de Corse et du clémentinier commun SRA92 placés dans les mêmes conditions que dans la seconde partie de la thèse. Le but de cette étude était de vérifier la capacité des porte-greffe tétraploïdes à transmettre leur tolérance au niveau de la variété greffée et ainsi confirmer ou infirmer leur intérêt pour l'agrumiculture.

Enfin, je présente un article consacré à l'étude de la diversité mitochondriale chez les agrumes à laquelle j'ai participé (article 3). Les marqueurs mitochondriaux de type PCR que j'ai défini pour cette étude nous ont été utiles dans la caractérisation génétique du génome mitochondrial hérité chez l'allotétraploïde FLHORAG1.

Rapport-Gratuit.com

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel végétal

L'impact du stress salin a été étudié sur le porte-greffe le plus sensible au sel, *Poncirus trifoliata* cv. Pomeroy. De même on s'est intéressé à une variété d'agrumes tolérante au sel, le mandarinier commun (*Citrus deliciosa* cv. Willow leaf). Dans le but d'une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la tolérance au sel chez les polyploïdes d'agrumes, notre recherche a inclus les autotétraploïdes spontanés respectifs aux deux génotypes diploïdes étudiés (*Poncirus* Pomeroy et le mandarinier commun), et leur hybride somatique allotétraploïde FLHORAG1 (*Poncirus* Pomeroy + mandarinier commun) qui a été créé par le CIRAD dans le cadre de l'amélioration des porte-greffe d'agrumes via l'approche 'hybridation somatique'.

Pour compléter notre étude, nous nous sommes intéressés à l'étude du comportement de ces porte-greffe polyploïdes lorsqu'ils sont greffés. Deux variétés d'agrumes, le cédratier de corse (*Citrus medica* cv. Corsican) et le clémentinier commun SRA92 (*Citrus clementina* hort. ex Tanaka) ont servi de greffons.

II. Conditions de croissance et application du stress salin

Deux expériences de stress salin ont été conduites durant cette recherche dans deux conditions de croissance différentes. La liste des génotypes utilisés dans chacune des deux expériences est résumée dans le tableau 3.

- **Expérience 1 (stress salin modéré).** Six plants âgés d'un an ont été placés en chambre de culture dans des conditions contrôlées de température (28°C), de photopériode (16/8) et d'humidité relative (60-80%). Le traitement salin a été appliqué pendant une durée de 9 semaines, la concentration en NaCl appliquée étant de 50mM. D'après Tozlu *et al.* (2000), la concentration optimale en sel pour étudier l'effet du stress salin sur le *Poncirus trifoliata* et sa descendance est comprise entre 40 et 60mM. Les plantes de chaque génotype ont été divisées en deux lots : un premier lot témoin correspondant aux pots ayant été trempés deux fois par semaine pendant une durée d'1h dans de l'eau additionnée de solution nutritive ((Fertil 28-14-14 (%N-P-K)) et un deuxième lot soumis à une contrainte saline correspondant aux pots ayant été trempés deux fois par semaine pendant une durée d'1h dans de l'eau salée (50mM) additionnée de solution nutritive.

- **Expérience 2 (stress à salinité croissante).** Six plants âgés de deux ans ont été placés en serre. Le traitement salin a été effectué pendant une durée de 8 semaines à une concentration de 50mM pendant les deux premières semaines, de 100mM pendant les 3 et 4^{èmes} semaines, de 200mM pendant les 5 et 6^{èmes} semaines et de 400mM durant les trois dernières semaines. Contrairement à l'expérience 1, les plants ont été arrosés quotidiennement pour éviter tout déficit hydrique. Le lot contrôle a été arrosé avec de l'eau additionnée de solution nutritive et le lot stressé à l'eau salée (50, 100, 200 et 400mM de NaCl) additionnée de solution nutritive.

Tableau 3. Liste des géotypes d'agrumes étudiés lors des deux expériences de stress salin

Géotypes	Nom et niveau de ploïdie	Expérience 1	Expérience 2
Francs de pied	<i>Poncirus trifoliata</i> cv. Pomeroy diploïde (PP2X) 'SRA 1074'	+	+
	<i>Poncirus trifoliata</i> cv. Pomeroy autotétraploïde (PP4X)	+	+
	Mandarinier commun (<i>Citrus deliciosa</i> cv. Willow leaf) diploïde 'SRA 133'	+	+
	Mandarinier commun (<i>Citrus deliciosa</i> cv. Willow leaf) autotétraploïde	+	+
	FLHORAG1	+	+
Greffés	Cédratier/PP2X	-	+
	Cédratier/PP4X	-	+
	Cédratier/FLHORAG1	-	+
	Clémentinier SRA92/PP2X	-	+
	Clémentinier SRA92/PP4X	-	+
	Clémentinier SRA92/FLHORAG1	-	+

+, géotype utilisé ; -, géotype non utilisé

III.Méthodologie

1.Caractérisation génétique des agrumes polyploïdes

1.1. Recherche des individus autotétraploïdes : cytométrie en flux

Les autotétraploïdes spontanés du *Poncirus trifoliata* et du mandarinier commun ont été identifiés parmi les plants diploïdes au moyen de la cytométrie en flux (PartecI, France) en utilisant le DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole) comme fluorochrome. Le DAPI se fixe au niveau des paires de bases A-T de la double hélice d'ADN permettant ainsi de mesurer la fluorescence relative de l'ADN nucléaire total pour chaque noyau coloré. Les spectres d'absorption et d'émission maximale sont respectivement de 340nm et de 465nm. Un tri des noyaux s'effectue alors selon la densité des fréquences des différents niveaux de fluorescence. Les résultats obtenus sont sous forme d'histogramme où la moyenne du pic est proportionnelle au contenu en ADN des noyaux. Pour ce faire, 0.5cm² de feuille de chaque génotype est broyé dans 250µL de tampon d'extraction (Partec), permettant ainsi de libérer les noyaux des cellules dans le tampon, puis passé sur filtre à 20µm. Le filtrat obtenu est mélangé à 400µL de fluorochrome DAPI, homogénéisé, puis passé au détecteur. Le FLHORAG1 a été utilisé comme témoin interne tétraploïde.

1.2.Recherche et élimination des individus zygotiques

Les individus diploïdes et tétraploïdes ont été soumis à une sélection par marqueurs moléculaires afin d'éliminer les individus zygotiques et ne garder que les nucellaires pour les expériences de stress salin. A cette fin, deux marqueurs nucléaires de type SSR (mCrCIR01F04a et mCrCIR07E05) définis par Froelicher *et al.*, (2008) et trois nouvellement définis (mCrCIRCI02D03, mCrCIR05A05 et mCrCIR02G12) ont été utilisés (article 1).

Si on suppose un individu hétérozygote pour un locus donné, après auto-fécondation, on obtient 50% de descendants homozygotes, donc d'individus zygotiques identifiés et 50% d'individus hétérozygotes (et donc identiques à leur mère pour le locus considéré). La probabilité qu'un individu zygotique soit identique à la mère pour n loci hétérozygotes sera

donc : $P = (0,5)^n$. Si cinq marqueurs hétérozygotes sont étudiés, le taux d'identification des zygotiques est de $1-(0,5)^5$ soit 97 % (Ollitrault et Faure, 1992).

2.Caractérisation de l'allotétraploïde FLHORAG1

2.1.Comptage chromosomique

Dans le but de confirmer la présence du double du lot chromosomique chez l'allotétraploïde FLHORAG1, les chromosomes ont été dénombrés selon le protocole de D'Hont *et al.*, (1996).

2.2.Héritabilité des génomes nucléaire et cytoplasmiques chez le FLHORAG1

De multiples combinaisons nucléo-cytoplasmiques peuvent être créées à l'issue de l'hybridation somatique. Afin de déterminer quel type d'association nucléaire, chloroplastique et mitochondriale renferme l'hybride FLHORAG1, nous avons amplifié des marqueurs nucléaires et chloroplastiques de type microsatellites SSR et des marqueurs mitochondriaux de type PCR qui sont polymorphes entre les parents Poncirus et mandarinier (article 1).

2.2.1.Extraction et quantification de l'ADN total

Les ADN totaux des deux parents diploïdes : le mandarinier commun et le *Poncirus Pomeroy*, et de leur hybride allotétraploïde FLHORAG1 ont été extraits selon le protocole de Doyle et Doyle (1987). L'ADN total a été extrait à partir d'1g de feuilles broyées dans l'azote liquide. Le tampon d'extraction TE1 (annexes) est rajouté au broyat afin de libérer les ADN totaux. Le mélange est vortexé et ensuite incubé à 65°C durant 1h. Afin d'éliminer les protéines, le mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1 ; v/v) est ajouté au mélange. Après centrifugation à 12000g pendant 5min, la phase aqueuse contenant les acides nucléiques est additionnée de 0,8 volume d'isopropanol. Le culot obtenu (ADN total) après centrifugation à vitesse maximale, est séché par évaporation rotatif sous vide et est ensuite resuspendu dans 50µL d'eau déminéralisée stérile.

La qualité des extraits d'ADN total obtenus est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du tampon Tris-Acétate 1x (TAE1x/annexes). 8µL de l'ADN total extrait sont additionnés de 2µL de tampon de charge 1 (annexes) puis déposés dans le gel. Après l'électrophorèse du gel durant 30min à 120V, ce dernier est placé dans un bain de bromure d'éthidium (BET) (10 µg/mL) durant 20min puis est visualisé sous UV.

Les concentrations d'ADN total ont été quantifiées par fluorimétrie (Hefer). Le fluorochrome utilisé, le Hoechst 33258 (2-[2-(4-Hydroxyphenyl) 1-6-benzimidazolyl]-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazole-trihydrochloride) se lie spécifiquement aux bases azotées A et T de l'ADN. Il absorbe, s'excite à 360nm et émet un signal fluorescent à 470nm. La concentration en ADN d'un échantillon donné est proportionnelle à la quantité de fluorescence qu'il émet. 2µL de l'échantillon d'ADN extrait est mélangé à 2mL de la solution fluorescente contenant 10µL de H33258, 10mL de tampon Tris NaCl EDTA (TNE 10x/annexes) et 90mL d'eau déminéralisée.

2.2.2.Amplification par réaction de polymérisation en chaîne PCR

L'amplification des génomes nucléaire, chloroplastique et mitochondrial a été réalisée par PCR à l'aide d'un thermocycleur de type Primus 96 plus MWG Biotech. Le mélange réactionnel était composé de 0.8 unités de l'enzyme Taq polymérase (Eurogentec), 10ng d'ADN total, 0.2mM de dNTP, 1.5mM de MgCl₂, 75mM de Tris-HCl (pH 8.8), 20mM de (NH₄)₂SO₄, 0.01% (v/v) de Tween 20, 0.2µM de l'amorce Forward (F) et 0.2µM de l'amorce Reverse (R) dans un volume total de 15µL. Le programme d'amplification débute par une dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 5min suivie de 40 cycles d'amplification de : dénaturation à 94°C pendant 30s, hybridation au T_m du couple d'amorces et élongation à 72°C pendant 1min30s. A la fin des cycles, une dernière élongation à 72°C pendant 4min est appliquée. Les produits d'amplification sont révélés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% dans du tampon de migration TAE 1x .

2.2.3.Electrophorèses sur gel de polyacrylamide dénaturants et non dénaturants

Les produits PCR de taille inférieure à 500pb sont révélés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 5% dénaturant (acrylamid:bisacrylamid (19:1 ; 40% (w/v)), urée 7M) à une

puissance électrique constante de 60W. Les fragments dont la taille est comprise entre 600pb et 1kb sont révélés sur gel de polyacrylamide 5% non dénaturant (acrylamid/bisacrylamid (29:1, 40% (w/v)), et sur gel de polyacrylamide 4% non dénaturant (acrylamid/bisacrylamid (29:1, 40% (w/v)) pour ceux dont la taille est comprise entre 1 et 2kb, à une puissance électrique constante de 12W. La composition des gels de polyacrylamide dénaturants et non dénaturants est détaillée dans le tableau 4.

L'électrophorèse est effectuée dans un tampon TBE 0.5x. Le gel est soumis à une pré-migration durant 30min et à une puissance électrique constante de 60 ou de 12W selon la nature du gel. Les échantillons d'ADN sont par la suite dénaturés en présence de formamide et de formaldéhyde à 94°C pendant 5min avant leur dépôt dans le gel. Dépendante de la taille des produits d'amplification, la migration est d'une durée de 2h pour les gels dénaturants et de 6 à 7h pour les gels non dénaturants. En se basant sur les travaux de Liu *et al.*, (2000), un changement du tampon de migration est effectué après 4h de migration sur gels non dénaturants.

La révélation des gels de polyacrylamide est réalisée au nitrate d'argent selon la méthode de Beidler *et al.*, (1982). La révélation débute par une fixation des bandes sur le gel de polyacrylamide par un bain d'éthanol 10% durant 20 min suivi d'un bain d'acide nitrique 1% de 5min. Deux lavages de 5min à l'eau déminéralisée sont réalisés avant de placer le gel dans le bain de nitrate d'argent (2g/L) durant 30min. Le gel est ensuite rincé à l'eau déminéralisée, puis est révélé dans un bain de solution de carbonate de sodium (NaCO_3 30g/L, formaldéhyde 600 $\mu\text{L/L}$) jusqu'à l'apparition des bandes et est lavé dans un bain d'acide acétique 5%.

3. Anatomie foliaire chez les agrumes polyploïdes

3.1. Mesure de la surface stomatique

La surface stomatique des plants diploïdes et tétraploïdes est mesurée sur un échantillonnage de 24 feuilles par génotype à l'aide d'un microscope optique (Laborlux K) selon le protocole de Morillon and Chrispeels, (2001). La longueur et la largeur sont mesurées sur 50 à 60 stomates par feuille.

3.2. Mesure de l'épaisseur foliaire

L'épaisseur foliaire des plants diploïdes et tétraploïdes est mesurée sur 10 feuilles à l'aide d'un micromètre (Mitutoyo, IP65, Japan).

3.3. Mesure de la croissance

Durant un mois, la croissance des plants diploïdes et tétraploïdes est suivie et mesurée à la règle chaque semaine.

3.4. Dosage du taux de chlorophylle

Le contenu foliaire en chlorophylle des plants diploïdes et tétraploïdes est mesuré sur les feuilles au moyen d'un SPAD meter (Minolta, SPAD-502, Japan). En se basant sur les propriétés photoréceptrices de la chlorophylle, sa quantité dans les feuilles a été déterminée par la mesure de l'absorbance dans deux plages de longueur d'ondes: le bleu (400-500nm) et le rouge (600-700nm).

4.Déterminants physiologiques du stress salin chez les agrumes polyploïdes

4.1. Mesure de l'efficacité du photosystème II

L'efficacité du PSII est évaluée par la mesure de la fluorescence de la chlorophylle 'a'. Cette mesure permet d'étudier le devenir de l'énergie lumineuse absorbée par les systèmes photosynthétiques et d'estimer le rendement de la photosynthèse. En effet, l'énergie lumineuse absorbée par les molécules de chlorophylle 'a' au niveau des feuilles a trois finalités. La majeure partie de la lumière absorbée est utilisée pour la photosynthèse et l'excédant d'énergie est soit dégagé sous forme de chaleur soit est réémis par la chlorophylle sous forme de fluorescence. Cette dernière représente uniquement 1 ou 2% de la lumière absorbée. Comme les trois processus se déroulent en compétition, le rendement en fluorescence n'est élevé que lorsque la photosynthèse et le dégagement de chaleur sont

réduits. En effet, lorsque le PSII absorbe de la lumière, le récepteur d'électron Quinone A Q_A reçoit directement un électron qu'il va transférer dans le cas normal à un deuxième récepteur d'électron, Quinone B Q_B . Dans le cas où l'électron n'est pas transféré de Q_A vers Q_B , le récepteur ne reçoit plus d'autres électrons, on dit que le centre réactionnel est fermé. La fermeture des centres PSII mène à une réduction globale de l'efficacité de la photosynthèse, entraînant ainsi l'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne.

L'efficacité de la photosynthèse a été évaluée pendant toute la durée du stress salin de l'expérience 2. Les mesures de rendement de fluorescence chlorophyllienne ont été effectuées une fois par semaine sur les plants sains et stressés. A l'aide du fluorimètre (Hansatech Ltd, Kings Lynn. UK), le rendement a été déterminé, après exposition de la feuille échantillon à une lumière de longueur d'onde connue, par la mesure de la quantité de lumière émise à une longueur d'onde différente. Le rendement de fluorescence chlorophyllienne est exprimé par le rapport F_v/F_m ,

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

où F_0 : fluorescence minimale émise par la chlorophylle 'a' excitée au niveau des PSII (valeur enregistrée lors de l'oxydation complète du Q_A) ;

F_m : fluorescence maximale, mesurée quand les Q_A sont complètement réduites ;

F_v : fluorescence variable ($F_v = F_m - F_0$).

4.2. Dosage minéral : concentrations foliaires et racinaires en Na^+ et en Cl^-

Pour l'échantillonnage de l'expérience 1, deux prélèvements de feuilles ont été effectués sur les plants témoins et stressés chaque semaine à partir du début du stress salin. Les feuilles sont séchées à l'étuve à 60°C pendant une semaine. Elles sont ensuite broyées au moyen d'un broyeur à bille (RETSCH). Entre 50 et 100mg du broyat obtenu sont mis en combustion dans un four à 400°C durant 2h. La cendre obtenue est ensuite resuspendue dans 100mL d'acide nitrique (0.5N). 30mL de cette solution sont utilisés pour le dosage du sodium foliaire et les 70mL restant ont servi pour le dosage des ions chlorures. Le dosage des cations Na^+ a été réalisé par ICP-MS 'Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer' au laboratoire de

l'Office de l'Équipement Hydraulique de Corse (OEHC). Le dosage des ions chlorures a été effectué au moyen d'une électrode spécifique aux chlorures (Thermo Orion).

Pour l'expérience 2, nous avons suivi la même procédure que pour l'expérience 1. De plus, le contenu en ions chlorures a été également mesuré au niveau des racines à la fin du traitement salin. Les dosages ioniques ont été effectués par ICP-MS à l'US 49 (CIRAD-PERSYST, Montpellier).

5. Etude transcriptomique de la réponse au stress salin chez les agrumes polyploïdes

5.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à partir de 3g de feuilles broyées dans l'azote liquide selon le protocole de Chomczynski and Sacchi (1987). Au broyat de feuilles sont additionnés 10mL de tampon d'extraction TE2 (annexes). Un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v) est ajouté au mélange, puis l'ensemble est soumis à une agitation rotative durant 30min. Après centrifugation à 5000g durant 10min, la phase aqueuse est récupérée et est mélangée à 0.2 volumes d'acétate de sodium 3M pH5.2 et 0.25 volumes d'éthanol absolu dans le but d'éliminer les polysaccharides. Le surnageant, récupéré après centrifugation à 5000g durant 10min, est additionné d'un volume de chlorure de lithium 4M afin de faire précipiter les ARN totaux. Le mélange est gardé pendant une nuit à 4°C puis centrifugé à 17000g durant 1h. Le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 70% et est resuspendu dans 1.5mL d'eau traitée au DEPC. La solution d'ARN est soumise à deux extractions organiques pour éliminer le maximum de protéines. Une première extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v) puis une deuxième au chloroforme/alcool isoamylique (24/1 ; v/v). Les ARN contenus dans la phase aqueuse sont précipités par 2 volumes d'éthanol absolu en présence d'acétate de sodium 3M à pH5.2 puis resuspendus dans 100µL d'eau traitée au DEPC (annexes) et stockés à -80°C.

La qualité des ARN totaux est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant à 1.2% contenant 20mM de MOPS à pH7 et 3.7% de formaldéhyde. L'échantillon d'ARN extrait (4µL) est additionné de 16µL de tampon de charge 2 (annexes) et le mélange est par la suite dénaturé à 65°C durant 10min puis est directement déposé sur le gel. La migration est

réalisée dans du MOPS 20mM à pH7 pendant 1h à 60-80V. L'observation du gel sous UV révèle deux bandes distinctes correspondant aux ARN ribosomiaux, 28S (4.7 kb) et 18S (1.8kb). La quantification des ARN totaux est réalisée par spectrophotométrie. L'absorbance de l'ARN total est mesurée à 260 et 280nm. Un rapport A_{260}/A_{280} de 1.8 à 2 est indicateur que l'ARN est purifié.

5.2. Analyse transcriptomique par la technique de cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

5.2.1.Principe de la technique cDNA-AFLP

La technique cDNA-AFLP permet l'obtention du profil des transcrits d'un tissu sous une condition donnée, reflétant ainsi l'état d'expression des gènes correspondants. Contrairement aux autres techniques dédiées à l'étude de l'expression des gènes telles que la RT-PCR en temps réel et les puces à ADN, le cDNA-AFLP ne nécessite aucune connaissance préalable de la séquence du génome de la plante étudiée ni la construction de banques d'ADN complémentaire (ADNc). L'AFLP combine les deux techniques de RFLP (Random Amplified Length Polymorphism) et de PCR. Elle se base en effet sur l'amplification PCR de l'ensemble des ADNc (construits à partir des transcrits ARNm) digérés à l'aide de deux enzymes de restriction tels que les enzymes AseI et TaqI. Aux bouts cohésifs créés par la digestion sont rajoutés des amorces arbitraires de 20 nucléotides dites adaptateurs. Les adaptateurs sont utilisés comme sites d'amorçage pour l'amplification des fragments digérés.

Cette étape dite de préamplification permet d'amplifier l'ensemble des fragments possédant les bases complémentaires aux bases arbitraires des amorces. Les conditions sont prévues pour privilégier l'amplification des fragments AseI-TaqI au détriment des fragments AseI-AseI et TaqI-TaqI. Dans une deuxième amplification dite sélective, les mêmes amorces prolongées à l'extrémité 3' d'un à 3 nucléotides arbitraires sont utilisées. Cette étape permet de n'amplifier que les fragments complémentaires aux bases arbitraires entraînant ainsi une réduction du nombre de fragments amplifiés. Une centaine de fragments sont au final révélés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant. Un fragment présentant un profil contrasté entre deux conditions données correspond à un transcrit exprimé

différemment lors de chacune d'elles. Les fragments présentant ainsi des profils d'expression différentiels sont ensuite excisés, réamplifiés et séquencés.

5.2.2. Technique

La technique de cDNA-AFLP a été appliquée aux ARN totaux extraits à partir du mélange de feuilles prélevées sur quatre plants par génotype durant la 7^{ème} semaine du traitement salin de l'expérience 1.

5.2.2.1. Isolement des ARNm et synthèse des ADNc double brin

Les ARNm sont isolés à partir de 200µg d'ARN totaux en utilisant le kit PolyATtract mRNA Isolation System III and IV (Promega). La synthèse du premier brin d'ADNc est réalisée par rétrotranscription sur 2µg des ARNm isolés. L'ADNc simple brin sert ensuite de matrice pour la synthèse des ADNc double brin en utilisant la RNase H et la DNA polymérase I (Universal Riboclone cDNA Synthesis System, Promega). Les ADNc double brin sont purifiés par extraction organique dans 1 volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v) saturé au tampon Tris-EDTA (10mM tris-HCl pH8.0 ; 1mM EDTA). Après centrifugation, la phase aqueuse est récupérée et est additionnée de 0.1 volume d'acétate de sodium 2.5M pH5.2 et de 2 volumes d'éthanol absolu afin de précipiter les ADNc. Le mélange est ensuite placé pendant 30min à -70°C. Une dernière centrifugation permet de récupérer le culot d'ADNc qui est ensuite lavé à l'éthanol 70% et resuspendu dans l'eau déminéralisée stérile.

5.2.2.2. La réaction AFLP

Les réactions AFLP sont réalisées selon la méthode de Vos *et al.*, (1995). 250ng d'ADNc double brin ont été dans un premier temps digérés en présence de 20 unités d'enzyme de restriction AseI (BioLabs, UK) dans un volume total de 40µL après incubation à 65°C durant 3h. Les fragments digérés avec AseI sont soumis à une seconde digestion avec 10 unités d'enzyme de restriction TaqI (BioLabs, UK) dans un volume total de 50µL après incubation à 37°C durant 3h. Pendant les incubations de digestion enzymatique, les adaptateurs double

brin sont préparés. 0.495μmoles d'adaptateur AseI 5' et 0.168μmoles d'adaptateur AseI 3' sont incubés dans un tampon d'hybridation (Tris-HCl 250mM pH 7.5 ; MgCl₂ 5mM) pendant 2min à 94°C puis à 24°C avec un refroidissement de -1°C/30s. De même les adaptateurs double brin TaqI ont été préparés en utilisant 2.961μmoles de TaqI 5' et 1.773μmoles de TaqI 3'. Par la suite les bouts cohésifs des fragments digérés (50μL) ont été liés avec les adaptateurs double brin AseI (1μL) et TaqI (1μL) à l'aide de l'ADN ligase T₄ (Universal Riboclone cDNA Synthesis System, Promega) dans un volume final de 60μL.

Dans une deuxième étape, dite de présélection, les fragments sont préamplifiés par PCR en utilisant comme amorces des oligonucléotides correspondant à la séquence des adaptateurs, prolongés en 3' par une base arbitraire, l'amorce Preamp Taq (5'-GATGAGTCCTGACCGA-3') et l'amorce Preamp Ase (5'-GACTGCGTACCTAAT-3'). La réaction de préamplification est réalisée dans un volume total de 50μL contenant 6μL des ADNc liant les adaptateurs, 1.5mM de MgCl₂, 75mM de Tris-HCl pH8.8, 20mM de (NH₄)₂SO₄, 0.01% de Tween 20, 0.25mM de dNTP, 100ng de chacune des amorces Preamp AseI et Preamp TaqI et 1.25 unités de l'enzyme *Taq* polymérase (Eurogentec). La réaction PCR est réalisée dans le thermocycleur MWG-Biotech Primus 96 selon le programme suivant : 30s à 72°C suivi de 25 cycles de : dénaturation de 30s à 94°C, hybridation de 30s à 52°C et élongation d'1min 30s à 72°C, et enfin une dernière élongation de 10min à 72°C. Les produits de préamplification sont ensuite révélés sur un gel d'agarose 1% qui permet de visualiser une trainée de bandes correspondant aux fragments digérés et amplifiés.

Les fragments préamplifiés sont ensuite dilués 30 fois et réamplifiés en utilisant les mêmes amorces utilisées pour la préamplification, sauf que celles-ci sont prolongées à leur extrémité 3' par deux bases arbitraires supplémentaires, Oligo AseI (5'-GACTGCGTACCTAATNN-3') et Oligo TaqI (5'-GATGAGTCCTGACCGANN-3') (Tableau 5). Cette amplification sélective est conduite dans un volume total de 25μL contenant 5μL des préamplifiats dilués, 1.5mM de MgCl₂, 75mM de Tris-HCl pH8.8, 20mM de (NH₄)₂SO₄, 0.01% de Tween 20, 0.25mM de dNTP, 50ng de chacune des amorces Oligo AseI et Oligo TaqI (tableau 5) et 1.25 unités de *Taq* polymérase (Eurogentec). 48 combinaisons d'amorces Oligo AseI et Oligo TaqI ont été testés : AseI4/(TaqI2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), AseI5/(TaqI2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), AseI6/(TaqI2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), AseI7/(TaqI2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), AseI8/(TaqI2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) et AseI9/(TaqI2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

L'amplification AFLP est réalisée avec le thermocycleur MJ Research, PTC 200 programmé sur : 30s à 94°C, (30s à 94°C, 30s à 62°C (avec un refroidissement de -0.7°C/cycle) et 1min à 72°C) x12, (30s à 94°C, 30s 52°C, 1min 72°C) x23 et une élongation finale de 10min à 72°C.

Tableau 4. Liste des amorces utilisées lors de l'amplification sélective en cDNA-AFLP.

Amorces AseI	Séquence 5'-3'	Amorces TaqI	Séquence 5'-3'
OligoAseI4	GACTGCGTACCTAAT CA	OligoTaqI2	GATGAGTCCTGACCGA AG
OligoAseI5	GACTGCGTACCTAAT CG	OligoTaqI3	GATGAGTCCTGACCGA AT
OligoAseI6	GACTGCGTACCTAAT CT	OligoTaqI4	GATGAGTCCTGACCGA CA
OligoAseI7	GACTGCGTACCTAAT GA	OligoTaqI5	GATGAGTCCTGACCGA CG
OligoAseI8	GACTGCGTACCTAAT GC	OligoTaqI6	GATGAGTCCTGACCGA CT
OligoAseI9	GACTGCGTACCTAAT GT	OligoTaqI7	GATGAGTCCTGACCGA GA
		OligoTaqI8	GATGAGTCCTGACCGA GC
		OligoTaqI9	GATGAGTCCTGACCGA GT

5.2.2.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant

Les fragments d'ADNc amplifiés sont séparés sur gel de polyacrylamide 5% dénaturant (acrylamid:bisacrylamid (19:1 ; 40% (w/v)), urée 7M) (Tableau 3) puis révélés au nitrate d'argent.

5.2.2.4. Isolement et séquençage des TDFs (Transcript Derived Fragments)

Les TDFs correspondent aux transcrits exhibant un profil d'expression contrasté par génotype et/ou par condition sur le gel de cDNA-AFLP. Les TDFs sont excisés du gel de

polyacrylamide, réhydratés pendant une nuit à 4°C et réamplifiés par PCR dans les mêmes conditions que l'amplification sélective. Les produits d'amplification sont purifiés en utilisant le kit de purification des produits PCR (Qiagen, Hollande) et ensuite envoyés à séquencer par MWG en Allemagne.

5.2.2.5. Analyse fonctionnelle des TDFs

La fonction des protéines correspondantes aux séquences des transcrits TDFs est recherchée sur le BLAST Network Service de la banque EST d'agrumes (Citrus Functional Genomics Project CFGP database ; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/blast.php>) et sur NCBI BLAST Network Service (NCBI, National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) en utilisant les deux algorithmes BLASTx et tBLASTx.

5.3. Analyse transcriptomique par PCR quantitative : RT-PCR en temps réel

5.3.1. Principe

La PCR quantitative (PCR en temps réel (sur ADN génomique), RT-PCR en temps réel (sur ADNc)) repose sur la mesure continue de la libération de fluorescence au cours des cycles PCR reflétant l'accumulation du produit PCR. La RT-PCR en temps réel permet la détermination/comparaison des niveaux d'expression des gènes via l'amplification des ADNc en présence d'un fluorochrome. La quantification réside dans la détermination du cycle seuil CT (Cycle threshold), ou dit encore le point CP (Crossing Point), qui correspond au nombre de cycles minimum nécessaire pour que la fluorescence dépasse le seuil (Figure 14). Ce dernier représente le début de la phase exponentielle d'amplification et est situé au dessus du bruit de fond. En effet, le CT pour une condition donnée est égal au nombre de cycles à partir duquel le signal de fluorescence dépasse le seuil. En quantifiant la fluorescence émise à chaque cycle, on peut suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible.

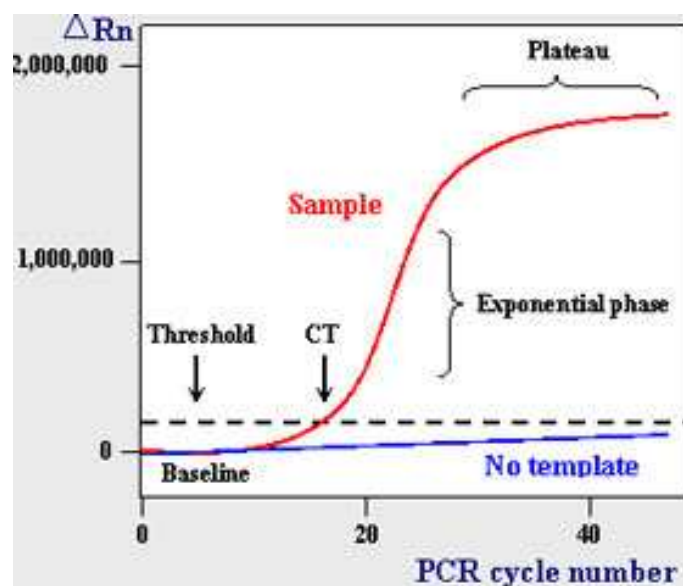


Figure 14. Modèle graphique de la PCR en temps réel (fluorescence en fonction du nombre de cycles PCR).

La quantification peut être réalisée de deux manières, absolue ou relative. La quantification absolue consiste en la détermination du nombre exacte de copies de la matrice cible. Cette mesure nécessite une gamme calibrée dont on connaît exactement le nombre de copies. La quantification relative consiste elle en la comparaison directe de deux conditions données et en la détermination du rapport de la quantité de cibles entre les deux conditions. Cette dernière approche nécessite la quantification en parallèle pour chaque condition.

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les sondes fluorescentes et les agents se liant à l'ADN double brin tel que le SYBR Green I. La PCR en temps réel basée sur le SYBR Green I ne nécessite aucune sonde fluorescente, sa spécificité repose entièrement sur ses amorces (Bustin, 2000). Elle n'est pas affectée par des mutations dans l'ADN cible qui influencent l'hybridation des sondes spécifiques (Mackay et al, 2002). Toutefois la technique SYBR Green I a des limites, elle présente des risques de détection de dimères d'amorces (mis-priming) et de produits PCR non spécifiques. D'une part les dimères d'amorces sont facilement détectables sur gel d'électrophorèse car ils génèrent souvent des bandes d'ADN superflues. D'autre part, les produits PCR non spécifiques peuvent être détectés grâce à la courbe de fusion du produit PCR final. La courbe de fusion correspond au suivi de la variation de la fluorescence du produit PCR en fonction de la température. Elle dépend de l'état d'hybridation du produit PCR et varie le plus lorsque la

température est égale au T_m . Afin de détecter tout produit PCR non spécifique, le produit PCR final est soumis à une augmentation de température de 65 à 85°C à raison de 0.1°C/sec, si la courbe montre un pic unique à la même température de fusion pour toutes les amplifications, l'amplification est spécifique. Au contraire, si la courbe de fusion montre plus d'un pic, les couples d'amorces sont considérés comme non spécifiques.

5.3.2. Technique

Les ARN totaux utilisés pour les RT-PCR en temps réel ont été extraits à partir des feuilles prélevées lors de la 7^{ème} semaine du traitement salin de l'expérience 2 (Tableau 3).

5.3.2.1. Purification et quantification des ARN totaux

Les ARN totaux extraits sont purifiés au moyen du RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hollande) incluant un traitement DNase (Qiagen, Leusden, The Netherlands). Une fois purifiés, les ARN totaux sont dans un premier temps dosés au spectrophotomètre à 260nm. Ensuite les ARN totaux sont quantifiés avec précision au fluorimètre FLUOstar Galaxy (BMG Labtechnologies, Allemagne) en utilisant le fluorochrome RiboGreen du RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probes, USA). Une courbe étalon est préalablement établie à l'aide d'une série de dilution de l'ARN standard fourni dans le kit.

5.3.2.2. Choix et définition des couples d'amorces

Contrairement à la nature aléatoire des couples d'amorces utilisés en cDNA-AFLP, la RT-PCR en temps réel nécessite des couples d'amorces spécifiques aux gènes dont l'expression est étudiée. Les séquences matrices sur lesquelles sont définis les couples d'amorces correspondent aux séquences des transcrits (ARNm) des gènes définis par cDNA-AFLP et ceux des gènes candidats disponibles sur les banques EST d'agrumes et d'autres espèces. La définition des couples a été réalisée sur le logiciel en ligne Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Les paramètres de définition étaient les suivants : le T_m entre 58 et 61°C, la taille des produits d'amplification entre 160 et 180pb, la

taille des amorces entre 18 et 20pb et le % GC compris entre 45 et 55 % afin d'éviter les appariements d'amorces. Dans l'article 2, les couples d'amorces définis et utilisés sont décrits pour l'étude de l'expression des gènes candidats.

5.3.2.3.Elaboration des courbes de calibrage

Le standard consiste en une solution titrée d'ADN de séquence identique à celle de l'ADN d'intérêt à quantifier. Pour chaque gène étudié, l'ADNc correspondant est construit par RT-PCR sur 100ng d'ARN total du mandarinier commun tétraploïde stressé. L'ADNc obtenu a servi d'ADNc standard pour l'élaboration de la courbe de calibration. Une série de dilution est réalisée et chacune des dilutions est utilisée pour une amplification. Il s'agit ensuite de définir le nombre idéal de cycles pour se placer dans la phase exponentielle de la réaction. Après vérification des courbes de fusion, les couples d'amorces amplifiant des fragments non spécifiques sont écartés. La courbe de calibration de chaque gène est ensuite établie avec les dilutions de l'ADNc standard (fluorescence = fonction (concentration)).

5.3.2.4.Quantification relative par RT-PCR en temps réel

La quantification relative est réalisée sur deux répétitions biologiques par génotype et par condition. Par échantillon, trois amplifications sont conduites en parallèle avec l'amplification de l'une des dilutions standards de la courbe de calibration et d'un témoin négatif (sans ARN). L'appareillage LightCycler 2.0 instrument (Roche, Diagnostics GmbH, Allemagne) utilisé réalise de manière successive la rétrotranscription et la réaction PCR sur le même échantillon. Dans les capillaires (LightCycler capillaries (20µL)), la réaction PCR est préparée dans un volume final de 10µL. 2.5µL d'ARN total (20ng/µL) sont rajoutés au mélange réactionnel contenant 2µL de vial1 (LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I), 0.25µM de l'amorce F, 0.25µM de l'amorce R, 2.5 unités de l'enzyme SuperScript II Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) et 1 unité de l'enzyme RNase Inhibitor (Applied Biosystems). Après la rétrotranscription de 30min à 48°C, les ADNc obtenus sont amplifiés selon le programme PCR : dénaturation de 10min à 95°C, (dénaturation de 2s à 95°C, hybridation de 10s au Tm du couple d'amorces (tableau 4), élongation de 15s à 72°C) x45. Les produits PCR finaux sont ensuite soumis à une augmentation de température de 42 à 95°C à raison de 0.1°C/s permettant l'obtention de la courbe de fusion.

RESULTATS

I. Résultats sous forme d'articles

1. Article 1

Comportement physiologique et expression génomique d'autotétraploïdes de *Citrus deliciosa* et de *Poncirus trifoliata*, et de leur hybride intergénérique allotétraploïde comparés aux parents diploïdes en condition de stress salin.

(Article 1, soumis à Tree Physiology)

Présentation de l'article 1

Les agrumes font partie des espèces cultivées les plus sensibles au stress salin et plus particulièrement aux ions chlorures. Les problèmes de salinisation des sols dus à l'irrigation obligent la sélection et la création de nouveaux porte-greffe d'agrumes tolérants au sel. Une des voies les plus prometteuses permettant la sommation des traits de résistance aux stress biotiques et abiotiques chez un même individu est celle de l'hybridation somatique. Le FLHORAG1, un des hybrides somatiques intergénériques allotétraploïdes créés par le CIRAD, a été obtenu par fusion de protoplastes du mandrinier commun (*Citrus deliciosa*) et du *Poncirus trifoliata* cv. Pomeroy. Au cours d'études antérieures, cet hybride a montré une tolérance au virus de la tristeza (trait hérité du parent Poncirus) et des propriétés de tolérance accrue au stress salin (trait hérité du parent mandarinier).

Dans notre étude nous avons comparé le comportement de l'hybride allotétraploïde FLHORAG1 en condition de stress salin modéré avec le comportement de ses parents diploïdes et de leurs autotétraploïdes respectifs. Avant le traitement salin, nous avons caractérisé le matériel végétal à différents niveaux : génétique, morphologique et végétatif, selon les approches suivantes :

- (1) vérification du niveau de ploïdie des autotétraploïdes par cytométrie en flux
- (2) numération chromosomique de l'hybride FLHORAG1
- (3) vérification de l'origine nucellaire des génotypes diploïdes

- (4) caractérisation des génomes nucléaire, chloroplastique et mitochondrial de l'hybride FLHORAG1 au moyen de marqueurs de types SSR et PCR.
- (5) mesure du contenu des feuilles en chlorophylle et mesure de l'épaisseur des feuilles et de la surface des stomates pour l'ensemble des génotypes.
- (6) mesure de la croissance des plantes.

Une fois caractérisé, le matériel végétal a été soumis à un stress salin modéré (50mM NaCl, arrosage deux fois par semaine). Chaque semaine, durant les 9 semaines de stress, des feuilles ont été prélevées sur l'ensemble du matériel végétal de manière à réaliser des dosages ioniques et à étudier l'expression des génomes. L'accumulation des ions sodium et chlorures dans les feuilles a été quantifiée pendant la durée entière du stress et a permis de choisir la date de prélèvement (35^{ème} jour de stress salin) qui semblait la plus adaptée pour étudier l'expression des génomes. Dans le but d'isoler des gènes impliqués dans la tolérance au sel des génomes diploïdes, autotétraploïdes et allotétraploïdes, nous avons utilisé la technique de cDNA-AFLP. Le cDNA-AFLP est une technique quantitative de l'expression différentielle des gènes : nous nous sommes basés sur l'absence/présence de bandes afin d'isoler les transcrits exprimés de façon différentielle entre les conditions témoins, de stress, et/ou entre les diploïdes et tétraploïdes. Les transcrits qui ont montré des expressions contrastées ont été isolés et séquencés.

Par cette étude, nous avons pu démontrer qu'en situation de stress salin modéré, les agrumes polyploïdes sont plus tolérants que leurs diploïdes respectifs. Le *Poncirus trifoliata* diploïde présentait des nécroses et une chute des feuilles au bout de 7 semaines de stress. Les *Poncirus* diploïde et autotétraploïde accumulaient de fortes concentrations d'ions chlorures au niveau des feuilles, ces mêmes génotypes n'accumulant pas d'ions sodium. Nous avons toutefois noté que les tétraploïdes du *Poncirus* ne présentaient aucun symptôme de chlorose. Les mandariniers diploïdes et autotétraploïdes accumulaient moins d'ions chlorures au niveau des feuilles que les *Poncirus*. En revanche, ils accumulaient de fortes concentrations de sodium, les concentrations les plus fortes étant observées chez les génotypes autotétraploïdes. L'hybride FLHORAG1, n'a présenté aucun symptôme de chlorose, ce génotype accumulant comme son parent *Poncirus* de fortes concentrations de chlorures mais pas d'ions sodium. Ainsi, chez les génotypes tétraploïdes d'agrumes, l'accumulation des chlorures ne serait pas le seul critère lié à la sensibilité au sel. La meilleure tolérance au sel des génotypes tétraploïdes pouvant être liée à une meilleure régulation des échanges gazeux associée à un ajustement osmotique et une détoxification cellulaire plus efficaces par rapport aux diploïdes. La technique

cDNA-AFLP nous a permis par ailleurs de mettre en évidence des expressions différentielles pour différents gènes possiblement impliqués dans la tolérance au sel.

Enfin, l'analyse des profils d'expression de l'ensemble des fragments de cDNA-AFLP, nous a permis de vérifier qu'en condition témoin, les génotypes autotétraploïdes présentaient des profils similaires à leur parents diploïdes et que l'allotétraploïde présentait des profils hérités soit du Poncirus, soit du mandarinier, avec toutefois une certaine dominance du mandarinier. En situation de stress salin, des changements de profils d'expression ont pu être mis en évidence entre diploïdes et tétraploïdes suggérant l'implication de mécanismes moléculaires pouvant réguler l'expression des génomes et permettant aux tétraploïdes de mieux s'adapter au stress salin.

Salt stress physiological behaviour and genomic expression of autotetraploids and allotetraploid intergeneric hybrid compared to their diploid *Citrus deliciosa* and *Poncirus trifoliata* parents.

Wafa Mouhaya¹, Thierry Allario¹, Gilles Costantino², Jean-Baptiste Bassene¹, Dominique Dambier¹, Abedlaziz Hmyene³, Bianca Elena Maserti⁴, Yann Froelicher¹, François Luro², Patrick Ollitrault¹ and Raphaël Morillon^{1*}

Keywords: citrus, polyploidy, rootstock, salt stress

¹Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative. Avenue Agropolis - TA A-75 / 02, 34398 Montpellier cedex 5, France

²Unité GEQA, Station INRA de San Giuliano, 20230 San Giuliano, France.

³Faculté des Sciences et Technique, Université Hassan II - FSTM BP 146, Mohammedia, Morocco.

⁴CNR - IBF, Istituto di BioFisica , Area della Ricerca, Via Moruzzi 1- I-56124 Pisa. Italy.

*Author to whom correspondence should be addressed. UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative du CIRAD, Centro de Genomica, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 46113 - Moncada - Valencia Spain. Phone: (00 34) 963 424 143 Fax: (00 34) 963 424 106. E-mail: raphael.morillon@cirad.fr

Abstract

Drought, calcareous soil, iron deficiency and salinity are the main abiotic constraints that encounter citrus trees. In the Mediterranean basin, because of water shortage, irrigation using water loaded with salt is frequent. Providing new rootstocks more tolerant to salt stress is then a requirement for a sustainable citrus industry. In this article, we investigated the physiological behaviour under salt stress condition and genomic expression of autotetraploids and an allotetraploid intergeneric hybrid (FLHORAG1) compared to their diploid *Citrus deliciosa* and *Poncirus trifoliata* parents.

The polyploid status of FLHORAG1 was checked by chromosomes count and using SSRs markers, the addition of the nuclear DNA of both parents in FLHORAG1 was demonstrated. As well we showed that this allotetraploid inherited chloroplasts from trifoliata orange and mitochondria from willow leaf mandarin. Leaf anatomy and plant growth of tetraploids were studied when compared to diploids. Plants were then submitted to a soft salt stress during nine weeks. At the end of the experiment, trifoliata orange tetraploids, Willow leaf mandarin genotypes and FLHORAG1 were clearly more tolerant to salt stress than diploid trifoliata orange since this last genotype was the only one that presented symptoms of chlorosis. Monitoring of the leaf sodium contents showed that trifoliata orange and FLHORAG1 were clearly sodium excluders whereas willow leaf mandarin genotypes accumulated sodium. In the meantime trifoliata orange genotypes and FLHORAG1 presented much higher leaf chloride accumulations than willow leaf mandarin genotypes. Using the cDNA-AFLP methodology, several transcript derived fragments (TDFs) showing qualitative expression alterations were identified. Diversity analysis of the studied genotypes using expression profile (expression *versus* non expression in control and stress conditions) of the TDFs showed that autotetraploids are very closely related to their respective diploids. FLHORAG1 inherited genes expression profiles from its both parents with a dominance of its Willow leaf mandarin parent. Purification, sequencing and analysis of the TDFs revealed several genes involved in different biological processes such as the biosynthesis of osmoticum or involved in the regulation of transcription.

Introduction

In order to cope with biotic and abiotic stresses, citrus varieties are grown on rootstocks. The main rootstocks currently used in the citrus industry belong to *Citrus* and *Poncirus trifoliata* genus. Indeed, numerous fertile hybrid rootstocks were obtained by crossing of members of the *Citrus* or by the crossing of members of *Citrus* with trifoliata orange (*Poncirus trifoliata*) (Barrett 1985). Generation of new hybrids such as citrange (Sweet orange x *Poncirus*) × or citrandarin (mandarin x *Poncirus*) allowed cumulating traits of tolerance to biotic stresses such as Tristeza, inherited from their trifoliata orange parent, and a greater tolerance to abiotic stresses inherited from their sweet orange parent.

Citrus rootstocks are propagated by polyembryonic seeds due to partial apomixis. As well, spontaneous tetraploid plants may arise in seedlings, with a frequency varying from 1 to 7 % (Barrett and Hutchinson 1982, Saleh et al 2008). These tetraploids arise from chromosome stock doubling of nucellar cells (maternal tissue). The rate of polyploids obtained in seedlings seems to be dependant on physiological and environmental factors (Barrett and Hutchinson 1982), the generated plant being the result of a chromosome stock doubling of the nucellar tissues (Cameron and Soost 1969). In citrus, autotetraploid varieties have a little interest for human consumption because they present a poor yield, a thick and an irregular fruit peel (Soost and Cameron 1975).

In a recent study, the interest of the use of autotetraploid citrus varieties as a new source of more resistant rootstocks to salt stress was investigated (Saleh et al 2008). Autotetraploid plants of trifoliata orange, Carrizo citrange and Cleopatra mandarin were shown to be more salt tolerant than their respective diploids.

Polyploid present specific morphological behaviours such as larger stomata and a decrease of stomata density (Rathnam et al 1980, Byrne et al 1981, Chen 2007), an increase of the number of chloroplasts per cell and an increase of the chlorophyll content (Byrne et al 1981, Jellings and Leech 1984, Warner et al 1987, Mathura et al 2006). Citrus tetraploid rootstocks had lower growth than their respective diploids that was associated to lower rates of whole plant transpiration (Syvertsen et al 2000, Saleh et al 2008). Hexaploid and tetraploid of wheatgrass were shown to be more tolerant to water deficit than diploid (Franck 1980). As well, Xiong et al (2006) shown that hexaploid wheat lines were more tolerant to water deficit than tetraploids. Tetraploid, pentaploid and hexaploid plum tree and paper birch were shown to be more tolerant to water deficit than their respective diploids (Pustovoitova et al 1996, Li et al 1996). Allopolyploidization is often accompanied by epigenetic processes such as modification in DNA cytosine methylation and transferable element activation. As well,

genetic remodelling caused by DNA rearrangements, gene activation, silencing and loss were also reported (Osborn et al 2003, Adams et al 2005). So, we may expect that in allotetraploids, the increase of the number of copies of alleles and epigenetic processes are factors leading to improved plasticity (Osborn et al 2003) and in our case improved tolerances.

Citrus rootstocks tolerance to salt stress has been widely investigated. Unlike most plant species that are affected by salt stress throughout sodium accumulation, damage caused by salinity in citrus trees is usually associated with accumulation of chloride (Cooper 1961, Bañuls et al 1997, Moya et al 2003). One way to improve salt stress tolerance is to limit the leaf chloride accumulation by limiting its absorption at the root level (Cooper et al 1952, Bañuls and Primo-Millo 1992, Bañuls and Primo-Millo 1995). Indeed, Cleopatra mandarin and Rangpur lime that are salt tolerant rootstocks were shown to be chloride excluders (Coopers 1961, Zekri and Parsons 1992) whereas trifoliate orange and its hybrids that are much more sensitive to salt stress, appear to be sodium excluders and chloride includers (Zekri and Parsons 1992, Garcia-Sanchez et al 2006). To date, mechanisms involved in chloride uptake are poorly documented. Identification of genes coding for chloride transporters is then a requirement.

In this work, we investigated a new allotetraploid rootstock, the FLHORAG1 (Ollitrault et al 2000), with its two diploid parents, trifoliate orange and willow leaf mandarin, as well as their autotetraploid genotypes, for salt stress tolerance in the same conditions described by Saleh et al (2008). Using the cDNA-AFLP methodology we isolated genes differentially displayed between tolerant and sensitive genotypes that are putatively related to salt stress sensibility and tolerance.

Materials and methods

Plant material

Diploid and autotetraploid of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf., cv Pomeroy, SRA 1074) and willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa*, SRA133) were provided by the Research Station of San Giuliano in Corsica, France. A somatic hybrid FLHORAG1 (Ollitrault et al 2000) which was obtained by electrofusion between diploid willow leaf mandarin and diploid trifoliate orange protoplasts, were investigated.

Plant conformity: plant ploidy status, plant nucellar / zygotic status and cytoplasm DNA origin in FLHORAG1

Tetraploid plants of trifoliate orange and willow leaf mandarin were identified by flow cytometry (Partec I, France) among diploid seedlings. FLHORAG1 seedlings were obtained from a tetraploid mother tree and all the seedlings were found to be tetraploid.

Eighteen previously reported simple sequence repeats markers (SSRs) (Froelicher et al 2007, 2008, Luro et al 2008) presenting polymorphic profiles for FLHORAG1 parents were selected to check its nuclear origin. Fourteen new polymorphic SSR markers between trifoliate orange and mandarin parents have been developed using the protocol described by Froelicher et al (2008) (Table 1).

The genetic constitution of the diploid and tetraploid seedlings was analysed using 5 SSRs markers: mCrCIR01F04a, mCrCIR07E05, mCrCIRCI02D03, mCrCIR05A05 and mCrCIR02G12 (Table 1).

Total DNA was extracted from leaf samples according to the method developed by Doyle and Doyle (1987). Amplifications were performed according to Kijas et al (1996) in a thermocycler (PTC 200, MJ Research) using 10ng of DNA, 0.5 μ M of each primer and 0.8 unit of *Taq* polymerase (Goldstar, Eurogentec). The annealing temperature was fixed for all primer pairs at 55°C. Separation of alleles was performed on a 6% polyacrylamide sequencing gel containing 7M urea in 0.5X TBE buffer at 60 W for 2h to 3h. Three microliters of PCR product was mixed to an equal volume of loading buffer containing 95% formamide, 0.25% bromophenol blue and 0.25% xylen cyanol, and 10mM of EDTA. This mixture was heated for 5 min at 94°C to denature the DNA before loading. Gels were stained with silver nitrate following the protocol detailed by Beidler et al (1982), for gel electrophoresis analysis and by comparison with the 10bp DNA standard ladder (Invitrogen).

To end, we characterized the chloroplastic and mitochondrial origin of the FLHORAG1. In order to investigate the chloroplast origin, three SSR markers were used: ccmp3, ccmp4 (Weising and Gardner 1999) and NTCp9 (Bryan et al 1999). To investigate the mitochondrial origin, we used two different markers, *nad7/1-2* and *nad5/2-1* (article 3/annexes).

Chromosomes numbering

Chromosome squash of FLHORAG1 was performed as described in D'Hont et al (1996) in order to confirm its tetraploid status.

Tetraploid leaf morphology, plant growth rate

A total of twenty diploid and tetraploid homogeneous plants of each genotype were selected and transplanted on the same substrate in 3 L pots and grown in greenhouse. Plants were watered with half diluted nutritive solution (fertilizer 28-14-14 (ref 205), Fertile, France).

At six months, leaf anatomy and morphology of polyploids were investigated when compared to their respective diploids: total leaf chlorophyll content was estimated using a SPAD meter (Minolta, SPAD-502, Japan). Leaf thickness of 10 leaves of each genotype was measured by using a micrometer (Mitutoyo, IP65, Japan). Preparation of slides for stomatal size analysis was performed according to Morillon and Chrispeels (2002). Stomatal size of 50 to 60 stomata was measured under a microscope. As well, using a ruler, plant growth of diploids and tetraploids was monitored for one month in the greenhouse.

Salt stress experiment

For each genotype, one-year-old plants were transferred in growth chamber. For each condition, salt stress and control conditions, 6 homogeneous plants were selected. After one month of acclimating, plants were watered by soaking pots for 1 hour twice a week either in water supplemented with half diluted nutritive solution, either in 50 mM NaCl solution supplemented with half diluted nutritive solution. Experiments were performed for 63 days. Temperature ranged from 16-18°C at night and from 28 to 30°C during the day, the relative humidity was maintained between 60 to 70% and the light/dark period was 16/8.

Mineral analysis: sodium and chloride content

Samplings for chloride and sodium content analysis were performed along the stress. For each date, two leaf samplings were harvested. Each sampling was the mix of two leaves of two different trees. All samplings were oven-dried at 60°C for several days, weighted, crushed in hammer-mill and stored at room temperature. Sodium and chloride analyses were carried out

on dried leaves according to Saleh et al (2008). Sodium and chloride content were expressed in mg / g dry weight.

Gene expression : cDNA-AFLP analysis

Sampling for gene expression analysis was regularly performed (0-d, 15-d, 35-d, 56-d). Each sampling was the mix of leaves of four different trees. Samplings were kept at minus 80°C.

RNA extraction. Total RNA was extracted from leaves collected the sixth week of the salt treatment according to Chomczynski and Sacchi (1987).

cDNA synthesis. Poly(A) + RNA were isolated from 200 µg of total RNA using a biotinylated oligo(dT) probe (PolyATtract mRNA Isolation System III and IV, Promega) according to the instructions of the manufacturer. Synthesis of the first-strand of cDNA was driven by reverse transcription on 2 µg of poly(A)+ RNA, from which the second-strand was synthesized using RNase H and DNA Polymerase I (Universal Riboclone cDNA Synthesis System, Promega).

cDNA-AFLP. AFLP reactions were performed according to Vos et al (1995). 250 ng of double-stranded cDNA were digested by *TaqI* and *AseI* restriction enzymes, ligated to *TaqI* and *AseI* adapters and pre-amplified with *Taq* (5'-GATGAGTCCTGACCGA-N-3') and *Ase* (5'-GACTGCGTACCTAAT-N-3') primers, corresponding to adaptors sequences added with an additional base. Pre-amplified fragments were 30-fold diluted and a selective amplification was carried out by the use of combinations of *Taq* and *Ase* primers with two additional bases on their 3' extremities. Amplified cDNA fragments were separated by electrophoresis in denaturing polyacrylamide gel (5% acrylamide / bisacrylamide 19:1, 40% (W/V), urea 7M) and revealed by silver staining according to Beidler et al (1982).

Data analysis of transcript derived fragments, TDFs.

The data matrix was composed of 35 TDFs (fragments that showed qualitative gene expression alterations, appearance or disappearance further to condition on the different gels) as variables and 5 genotypes. Fragments were scored as 1 for the presence or 0 for the absence. Tree representations were obtained from the presence or absence of the variables and matrices of Dice dissimilarities using @DARwin 4.0 software (CIRAD Montpellier, France). Dice's dissimilarities were calculated as follows:

$$d(i,j) = (b + c)/(2a + b + c)$$

where $d(i,j)$) dissimilarity between genotypes i and j , a) number of variables where x_i) presence and x_j) presence; b) number of variables where x_i) presence and x_j) absence; c) number of variables where x_i) absence and x_j) presence.

Isolation and sequencing of transcript derived fragments, TDFs.

Ploidy and/or salt stress-regulated TDFs were excised from the cDNA-AFLP polyacrylamid gels, hydrated and then recovered by PCR under the same conditions used for the pre-amplification. Purified PCR products were ligated to the pUCm-T vector (Bio Basic Inc. DNA cloning vector kit). The clones were then sent for sequencing to MWG-Biotech (Germany).

Gene function analysis. Database searches were performed using the BLAST Network Service (NCBI, National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Each TDF was searched among all sequences in the non-redundant databases using the BLASTN and TBLASTX algorithms and in the citrus EST database (CFGP database, Citrus Functional Genomic project, <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics:cfgpDP:blast.php>)

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SIGMASTAT from SPSS (Chicago; www.spss.com_software_science) to analyze the data. The *t* test and ANOVA test were used to detect differences at the usual probability level of $P < 0.05$.

Results

Tetraploid obtaining and genetic constitution analysis

Using flow cytometry, tetraploids were screened among seedlings from mother trees of the San Guiliano germplasm. The percentage of tetraploid trifoliate orange (5.1 %) was almost identical than in Saleh et al (2008) since seedlings were obtained the same year and from the same mother tree. For willow leaf mandarin, 1207 plantlets were screened and 4 percent of tetraploids were obtained. SSRs markers were used to control the nucellar (apomictic) origin of seedlings. Among 77 plants we screened, only two diploid were found to be zygotic (one trifoliate orange over 40 plants and one willow leaf mandarin among 37 plants we tested). Only nucellar plants were kept for further investigations.

Chromosome squash and microscopic observation were performed for FLHORAG1. On Figure 1, 36 chromosomes can clearly be observed. Using 32 SSRs markers, we checked as well that FLHORAG1 arise from the addition of the whole nuclear genome of its two parents. Specific alleles of each parent were always present in FLHORAG1 (Table 1).

The parental chloroplastic and mitochondrial origin of FLHORAG1 was investigated. Three SSRs, ccmp3, ccmp6' and NTCP9', clearly revealed that FLHORAG1 inherited chloroplasts from its trifoliate orange parent as shown on Table 2. As well, using mitochondrial markers, we characterized the parental mitochondrial origin of FLHORAG1 (Table 2). Both mitochondrial markers clearly showed that FLHORAG1 inherited mitochondria from its Willow leaf mandarin parent

Tetraploid leaf morphology, plant growth rate

FLHORAG1 inherited trifoliate leaves from its trifoliate orange parent. All the tetraploid plants were greener when compared to their respective diploids. Chlorophyll contents measured using SPAD meter confirmed those results since the chlorophyll contents of tetraploids were at least 20% higher than for diploids (Table 3). As well leaf thickness of tetraploids was greater as shown on figure 2B. Investigation of stomatal size revealed that tetraploids presented much bigger stomata than diploids (Table 3). Trifoliate orange, Willow leaf mandarin and FLHORAG1 plant growth rates were investigated. In the greenhouse growth conditions, autotetraploid plants height was significantly smaller when compared to their respective diploids as already observed by Saleh et al (2008), (Table 3). FLHORAG1 plants were more vigorous than trifoliate orange tetraploids since a grater growth rate was

observed, even so, a three weeks delay of germination was observed when compared to other genotypes (Table 3).

Salt stress and ion content

One year diploid and tetraploid plants were submitted to a 50 mM salt stress for 56 days in a growth chamber. At the end of the experiment diploid trifoliolate orange was the only genotype that presented leaf fall and symptoms of chlorosis. Tetraploid trifoliolate orange, Willow leaf mandarin and FLHORAG1 did not present any symptom.

Leaf ion contents were monitored each week. On figure 2 is presented the sodium and chloride leaf contents measured along the stress. Sodium accumulation was almost inexistent in trifoliolate orange genotypes and FLHORAG1 (Fig. 2A & C). However, Willow leaf mandarin genotypes accumulated a lot of sodium (Fig. 2B), tetraploid plants accumulating significantly more sodium than diploids. Trifoliolate orange and FLHORAG1 presented a significant increase of chloride content that was similar for diploid and tetraploid genotypes (Fig. 2D & F). Chloride accumulation was very slight in Willow leaf mandarin genotypes, accumulation being similar for diploid and tetraploid plants.

Gene expression - cDNA-AFLP analysis

After 35 days of stress, a significant increase in chloride leaf content was observed for FLHORAG1 stressed plants when compared to controls. As well, a significant increase of the leaf sodium content was also observed for Willow leaf genotypes. However, after 35 days of stress, no symptom of chlorosis was yet observed in diploid trifoliolate orange. We choose this date for genes expression analysis assuming that mechanisms for salt stress tolerance were triggered. On the different gels have detected 35 TDFs that presented contrasted expression depending of the genotype, the ploidy level or the growth conditions: 23 TDFs presented polymorphism in control condition, whereas 29 TDFs presented polymorphism in stress condition. FLHORAG1 presented additive profiles for 22 TDFs when compared with its diploid parents. However, FLHORAG1 presented 6 specific TDFs (5 expressed in stress condition). Moreover one TDF expressed in diploid and autotetraploid in both stress and control condition appeared to be repressed in FLHORAG1. 4 TDFs were specific of autotetraploid Willow leaf mandarin (4 expressed in stress condition), 2 being specific of autotetraploid trifoliolate orange (2 expressed in control condition), 1 being specific of diploid and autotetraploid Willow leaf mandarin (stress condition). All the TDFs observed were used to compare the dissimilarity between parents, their respective autoteraploid and the allotetraploid

FLHORAG1 hybrid. On figure 3 is presented the relationship tree obtained from 35 TDFs profiles characterized. Clusters obtained for control and stress conditions were very similar. Whatever the conditions, dissimilarities between FLHORAG1 and Willow leaf mandarin were about half smaller than between FLHORAG1 and trifoliate orange. In a single addition of genomes producing the allotetraploid hybrid, these differences reflect the higher number of genes expressed in FLHORAG1 inherited from its mandarin parent than from its trifoliate orange parent. Furthermore, this relationship representation revealed the effect of salt stress on genome expression. For Willow leaf mandarin genotypes, in control condition, no difference was observed in cDNA-AFLP profiles between diploid and tetraploid plants. However, under salt stress, the dissimilarity between them, increased to 0.16. It is worth to note that in stress condition, tetraploid trifoliate orange is getting closer to FLHORAG1. All TDFs used for genetic analysis were excised, amplified and sent for sequencing. Over the 35 products of PCR sent for sequencing, 23 did not match with any known genes and 12 presented similarity E value $< 1.e^{-5}$ with EST citrus sequences of the database. On the gel, those 12 genes were identified to be up or down regulated depending of the genotypes, the level of ploidy or the plant growth condition (Table 4). One cDNA coding for a putative group 5 late embryogenesis abundant protein (TDF n°3) is expressed only in diploid parents and the respective autotetraploids and not in FLHORAG1. A putative choline monooxygenase cDNA (TDF n°2) was shown to be specific of tetraploids. Three TDFs were expressed only in stressed Willow leaf mandarin (n°1, 5, 7) and two in tetraploid trifoliate orange (TDFs n° 4, 6). Other identified TDFs were expressed in FLHORAG1 and in one of its two genitors (TDFs n° 8 to 13).

Discussion

In ligneous plants such as plum tree and paper birch, Pustovoitova and al, (1996) and Li and al, (1996) shown that tetraploid, and even pentaploid and hexaploid plants, are more tolerant to water deficit than the respective diploids. In a recent study, we observed that tetraploid rootstocks are more tolerant to salt stress than their respective diploid (Saleh et al 2008).

In this article, we characterized genetically and physiologically a new allotetraploid rootstock. As well, we investigated its property of salt stress tolerance when compared to respectively its diploid parents and their autotetraploid. Using cDNA-AFLP methodology we isolated genes up or down regulated depending of ploidy status and the growth conditions.

Search of tetraploid and zygotic plants shown that most of the seedlings from a diploid mother tree are nucellar (less than 5% of tetraploid plants and less than 3% of zygotic plants) as already observed by Saleh (2008). Chromosome squash of FLHORAG1 and use of SSRs markers, allowed checking that this allotetraploid arise from the addition of the whole nuclear genome of its both parents without any deletion events and inherited chloroplasts from trifoliate orange and mitochondria from Willow leaf mandarin.

Tetraploid leaf anatomy and morphology, plant growth rate

Tetraploid leaves are greener and thicker than the ones of diploids. We then may expect that the greater chlorophyll content measured in tetraploids with the SPAD could be explained by the leaf greater thickness (Tab. 2A & B). Indeed, FLHORAG1 presented the same chlorophyll contents than tetraploid trifoliate orange and their contents were greater than for diploids. This result is not surprising since FLHORAG1 is tetraploid and it has been shown that tetraploids have more chloroplasts than diploid and then an increase of the chlorophyll content (Byrne et al 1981, Jellings and Leech 1984, Warner et al 1987). In naturally occurring tetraploid and hexaploid varieties of wheat, it has been reported that plants present larger stomatal size and reduced stomatal density (Li and al 1996, Xiong et al 2006), as well as an increase of the photosynthesis activity for wheatgrass polyploids (Franck 1980). In tetraploid trifoliate orange, Willow leaf mandarin and FLHORAG1, stomates were clearly bigger than for diploids (Fig. 2C). As well, tetraploid plant growth was faster for diploids when compared to their autotetraploids (Table 3). We may assume that in non limited growth condition, plant growth is mainly dependant to the photosynthetic activity and then to the stomata conductance and leaf conductance to CO₂ (Garret 1978). Because of the differences in stomatal size and leaf thickness between diploids and tetraploids, it is difficult to clear up what is the most

important factor responsible of the slower growth of tetraploids. However, Syvertsen et al (2000) observed that citrus tetraploid rootstocks had lower rates of whole plant transpiration suggesting that the control of stomata conductance may be the most important factor controlling the growth of polyploids. Interestingly, the allotetraploid FLHORAG1 presented a growth rate faster than the autotetraploid of its parents suggesting heterosis (Table 3). In the salt-marsh specie *Spartina anglica*, allopolyploids were characterized by rapid expansion and larger ecological amplitude than their respective diploid progenitors (Salmon et al, 2005). For those authors, allopolyploid speciation seems to be associated with rapid genetic and epigenetic changes facilitating plant adaptation for land invasiveness.

Symptoms of chlorosis and ions contents in leaves

In our salt stress conditions diploid trifoliolate orange is the only genotype that presented leaf fall and chlorosis as already reported by Saleh et al (2008). Investigation of ions contents clearly shown that trifoliolate orange genotypes were sodium excluders as mentioned in the literature (Elgazzar et al 1965, Zekri et al 1992) whereas Willow leaf variety genotypes had the property to accumulate sodium (respectively Fig. 2A & B). Interestingly, Willow leaf mandarin tetraploids accumulated more sodium than the respective diploid. So, it is possible that a greater leaf thickness associated to a greater cell size in tetraploids may lead to a greater sodium accumulation. FLHORAG1 inherited from its trifoliolate orange parent the capacity to exclude sodium (Fig. 2C). According to the literature, citrus salt stress sensitivity is due to chloride (Romero-Aranda et al 1998). Indeed diploid trifoliolate orange that presented leaf chlorosis, presented also high chloride contents (Fig. 2D). However, as mentioned before, even if the chloride contents for diploid and tetraploid trifoliolate orange genotypes were similar, no leaf fall and no symptom of chlorosis were observed in tetraploid. In our conditions, it is not surprising that Willow leaf mandarin variety genotypes did not accumulate much chloride since Willow leaf is close related to the Cleopatra mandarin rootstock that is one of the most salt tolerant rootstock known to be chloride excluder (Cooper 1961, Zekri et al 1992). As well, in FLHORAG1, that was not affected of any salt stress symptom, chloride accumulation was not significantly different than for diploid and tetraploid trifoliolate orange genotypes. Altogether, those results suggest that the leaf chloride content is not the only criteria for salt sensitivity as already proposed by Saleh et al (2008). In stress conditions, better regulation of gas exchanges associated to a better osmotic adjustment and a better efficiency to eliminate reactive oxygen species may explain the greater tolerance

observed in polyploids as it was described in diploid species (Du Plessis 1985, Syvertsen and Levy 2005, Mittler et al 2004).

Gene expression - cDNA-AFLP analysis

After 35 days of stress, change of leaf chloride and sodium contents were respectively observed for willow leaf and FLHORAG1 genotypes, even so no symptom of stress was observed. As well, changes in genes expression profiles were observed on cDNA-AFLP electrophoresis gels suggesting that plants reacted to the stress. All the TDFs fragments we analyzed were excised, newly amplified and sequenced. Changes of expression of genes involved in biosynthesis of osmoticum such as choline monooxygenase or group 5 late embryogenesis abundant protein genes were observed. The choline monooxygenase genes encode for an enzyme of the biosynthesis pathway of glycine betaine. This gene was only expressed in tetraploid suggesting that more osmoticum may be synthesized in polyploids and may facilitate their adaptation to abiotic stress (Hayashi et al 1998, Saneoka et al 1995). Genes coding for different serine/threonine phosphatase or involved in regulation of the transcription (zinc finger protein) were up or down regulated depending if they were studied in trifoliate orange, willow leaf mandarin or FLHORAG1.

The differentiation of gene expression between the studied genotypes was greater in stress condition (29 polymorphic TDFs) than in control condition (23 polymorphic TDF). The dissimilarity clusters obtained from TDFs in control and stress conditions were very similar for diploid and tetraploid genotypes and FLHORAG1 being in between its two parents (Fig. 3). 6 TDFs were specific of FLHORAG1, 4 were specific of autotetraploid Willow leaf mandarin, 2 were specific autotetraploid trifoliate orange. In control condition, the data we obtained were in agreement with previous results obtained in arabidopsis in non stress condition. Indeed it has been shown that changes in gene expression due to epigenetic regulation occurred mostly in allotetraploid and very limited changes were observed in arabidopsis autotetraploid genotype (Wang et al 2005). However, it is interesting to note that stress condition, changes in genes expression occurred in between Willow leaf and trifoliate orange diploid and autotetraploid plants suggesting the involvement of gene expression regulation mechanisms. In allotetraploid plants of cotton, it has been shown that among 40 gene pairs, 27 homeologues contributed equally to the transcriptome and 13 of them exhibited biased expression or silencing (Adams et al 2004). Interestingly, it seems that FLHORAG1 inherited a dominance of gene expression of its Willow leaf mandarin parent when compared to trifoliate orange (Table 4), the dissimilarity being smaller between FLHORAG1 and

Willow leaf mandarin than between FLHORAG1 and trifoliate orange (Fig. 3). This result is in agreement with a proteomic study in allotetraploids citrus (Gancel et al 2006) that shown a predominant protein expression of diploid Willow leaf mandarin when compared to the other parents, lime and kumquat. In stress condition, trifoliate orange tetraploids were found closer to FLHORAG1. It is possible those convergent gene expression changes could be associated to greater adaptation to salt stress of tetraploid. However, we may not exclude that other mechanism such as post transcriptional processes are also involved and may lead to a better tolerance in autotetraploid and allotetraploid.

In order to confirm the involvement of those genes in citrus salt stress tolerance or in the phenotypical making of tetraploids, it will be required to characterize the expression of those genes by real time RT-PCR. It would be also interesting to study autotetraploid rootstocks and allotetraploid genotypes such as FLHORAG1 when grafted, as well as gene expression to confirm the interest of tetraploid as a new source of rootstocks for the citrus industry.

Funding

Comité Mixte Inter Universitaire Franco-Marocain” (Programme Volubils, MA/05/137) to W M. Interreg IIIA program, European “INCO” project (FP6 – 2003 - INCO – DEV – 2 n° 015453).

Acknowledgements

We thank C. Jacquemond, F. Curk (Unité GEQA, INRA, San Giuliano, France) for providing diploid seedlings and technical assistance. Francois Santoni from Office de l’Equipement Hydraulique de la Corse (OEHC) is also thanked for ICP assays.

References

- Adams K.L., R. Percifield and J.F Wendel. 2004. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics*. 168:2217–2226
- Adams, K. L. and J. F. Wendel. 2005. Allele-specific, bi-directional silencing of an alcohol dehydrogenase gene in different organs of interspecific diploid cotton hybrids. *Genetics*. 171:2139-2142.

- Bañuls, J. and E. Primo-Millo. 1992. Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of Citrus plants. *Phys. Plantarum* 86:115-123.
- Bañuls, J. and E. Primo-Millo. 1995. Effect of salinity on some citrus scion-rootstock combinations. *Ann. Bot.* 76:97-102.
- Bañuls J., Serna, M.D., M. Legaz and E. Primo-Millo. 1997. Growth and gaz exchange parameters of citrus plants stressed with different salts. *J. Plant Phys.* 150:194-199.
- Barrett, H.C. 1985. Hybridization of citrus and related genera. *Fruit Varieties J.*, University Park, 39:11-16.
- Barrett, H.C. and D.J. Hutchinson. 1982. Occurrence of spontaneous octoploidy in apomictic seedlings of a tetraploid *Citrus* hybrid. *Proc. Int. Soc. Citric.* 1:29-30.
- Beidler, J. L., P. Hilliard and R. L. Rill. 1982. Ultrasensitive Staining of Nucleic Acids with Silver. *Anal. Biochem.* 126:374-380.
- Bryan, G.J., McNicoll, J. , Ramsay, G., R.C. Meyer and W.S.D. Jong. 1999. Polymorphic simple sequence repeat markers in chloroplast genomes of *Solanaceous* plants. *Theor. Appl. Genet.* 99:859–867.
- Byrne, M.C., C.J. Nelson and D.D. Randall. 1981. Ploidy effects on anatomy and gaz exchanges of tall fescue leaves. *Plant Physiol.* 68:891-893.
- Cameron, J.W. and R.K. Soost. 1969. Characters of new populations of *Citrus* polyploids, and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny, in: H.D. Chapman (Eds.), *Proc. Int. Citric. Symp.*, University of California at Riverside 1:199–205.
- Chalhoub, B.A., Thibault, S., Laucoou, V., Rameau, C., H. Höfte and R. Cousin. 1997. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *BioTechniques.* 22:216-220.
- Chen, Z.J. 2007. Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Ann. Rev. Plant Biol.* 58: 377-406.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-9.
- Cooper W.C. 1961. Toxicity and accumulation of salt in citrus trees on various rootstocks in Texas. *Proc. Fla State Hortic. Soc.* 74:95-104.
- Cooper W.C. and B. S. Gorton. 1952. Toxicity and accumulation of chloride salts in *citrus* on various rootstocks. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 59:143-146.
- D'Hont A., Grivet, L., Feldmann, P., Rao P., N. Berding and J.C. Glaszmann. 1996. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* 250:405-413

- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1997. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19:11-15
- Du Plessis, H.M. 1985. Evapotranspiration of citrus as affected by soil water deficit and soil salinity. *Irr. Sci.* 6:51-61.
- Elgazzar A., A. Wallace and N. Hemaïdan. 1965. Sodium distribution in rough lemon and trifoliate orange seedlings. *Soil Sci.* 99:387-391.
- Franck, A.B. 1980. Photosynthesis, transpiration and ribulose biphosphate carboxylase of selected crested wheatgrass plants. *Agron. J.* 72:213-316
- Froelicher, Y., Bassene, J-B., Jedidi-Neji, E., Dambier, D., Morillon, R., Bernardini, G., G., Costantino and P. Ollitrault. 2007. Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Reports.* 26:937-944.
- Froelicher, Y., Dambier, D., Bassene; J-B., Costantino, G., Lotfy, S., Didout, C., Beaumont, V., Brottier, P., Risterucci, A-M., F. Luro and P. Ollitrault. 2008 Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Mol. Ecol. Res.* 8:119-122.
- Gancel, A.L., Grimplet, J., Sauvage, F.X., P. Ollitrault and Brillouet J.M. 2006. Predominant expression of diploid mandarin leaf proteome in two citrus mandarin-derived somatic allotetraploid hybrids. *J. Agric. Food Chem.* 54 :621266218.
- García-Sánchez, F., Syvertsen, J.P., V. Martinez and J.C. Melgar. 2006. Salinity tolerance of Valencia' orange trees grafted on contrasting rootstocks is not improved by moderate shade. *J. Exp. Bot.* 57:3697-3706.
- Garret, MK. 1978. Control of photorespiration at RuBP carboxylase / oxygenase level in ryegrass cultivars. *Nature.* 274:913-915.
- Hayashi, H., Sakamoto, A., Nonaka, H., T.H.H. Chen and N. Murata. 1998. Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase. *J. Plant Res.* 111:357–362.
- Jellings, A.J. and R.M. Leech. 1984. Anatomical variation in first leaves on nine *Triticum* genotypes and its relationship to photosynthetic capacity. *New Phytol.* 96:371-382.
- Kijas, J.M.H., Thomas, M.R., J.C.S. Fowler and M.L. Roose. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of citrus. *Theor Appl Genet.* 94:701-706.

- Li, W.L., G.P. Berlyn and M.S Ashton. 1996. Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera* (*Betulaceae*). *Am. J. Bot.* 83:15-20.
- Mathura, S., A. Fossey and S.L. Beck. 2006. Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black wattle (*Acacia mearnsii*). *Forestry.* 79:381-388.
- Morillon R. and M.J. Chrispeels 2001. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 14138-14143.
- Moya, J.L., Gomez-Cadenas, A., E. Primo-Millo and M. Talon. 2003. Chloride tolerance in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water usage, *J. Exp. Bot.* 383:825-833.
- Mittler, R., Vanderauwera, S. M. Gollery and F. Van Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9:490-487.
- Ollitrault, P., Dambier, D., M. Seker and Y. Froelicher. 2000. Rootstock breeding by somatic hybridization for the Mediterranean citrus industry. *Acta Horticulturae.* 535: 157-162.
- Osborn T.C., Pires J.C., Birchler J.A., Auger D.L., Chen Z.J., Lee H.S., Comai L., Madlung A., Doerge R.W., V. Colot and R.A. Martienssen. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* 19:141–147.
- Pustovoitova, T.N., Eremin, G.V., Rassvetaeva, E.G., N.E. Zhdanova and V.N. Zholkevich. 1996. Drought resistance, recovery capacity, and phytohormone content in polyploid plum leaves. *Russian J. Plant Phys.* 43:232-235.
- Rathnam, C.K.M. and R. Chollet. 1980. Phtotsynthetic and photorespiratory carbon metabolism in mesophyll protoplasts and chloroplasts isolated from isogenitc diploid and tetraploid cultivars of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Physiol.* 65: 489-494.
- Romero-Aranda, R., Moya, J.L., Tadeo, F.R., Legaz, F., E. Primo-Millo and M. Talon. 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant, Cell and Env.* 21:1243-1253.
- Saleh B., Allario T., Dambier D., P. Ollitrault and R. Morillon. 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *C. R. Biol.* 331:703-710.
- Salmon A., M. Ainouche and Wendel J. 2005. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology.* 14: 1163-1175.

- Saneoka, H., Nagasaka, C., Hahn, D.T., Yang, W.J., Premachandra G.S., R.J. Joly and D. Rhodes. 1995. Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. *Plant Physiology*. 107:631–638.
- Soost, R.K. and J.W. Cameron. 1975. *Citrus*, in: J. Janick, J.N. Moore (Eds.), *Adv. in Fruit Breed.* pp 507-540.
- Syvertsen J.P., L.S. Lee and J.W. Grosser (2000). Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 125: 228-234.
- Syvertsen, J. and Y. Levy. 2005. Salinity interactions with other abiotic and biotic stresses in citrus. *Horttechnology* 15:100-103
- Wang, J., Tian, L., Lee, H-S, Wei, N., Jiang, H., Watson, B., Madlung, A., Osborn, T., Doerge, R. D., L. Comai and Z. J. Chen. 2006. Genome-wide Non-additive Gene Regulation in Arabidopsis Allotetraploids . *Genetics*. 172:507-517.
- Warner, D.A., M.S.B. Ku and G.E. Edwards. 1987. Photosynthesis, leaf anatomy, and cellular constituents in polyploidy C4 grass *Panicum virgatum*. *Plant Physiol.* 84: 461-466.
- Weising K. and R.C. Gardner. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42:9-19
- Xiong Y-C, F-M. Li and T. Zhang. 2006. Performance of wheat crops with different chromosome ploidy : root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. *Planta*. 224:710-718
- Zekri M. and L.R. Parsons. 1992. Salinity tolerance of *citrus* rootstocks: Effect of salt on root and leaf mineral concentrations, *Plant Soil*. 147:171-181.

Figure captions

Figure 1: Chromosomic number of the FLHORAG1 allotetraploid. On the picture, 36 chromosomes are clearly present.

Figure 2: Leaf sodium and chloride content (mg/g dry weight) from diploid and tetraploid of trifoliate orange (4A & 4D), willow leaf mandarin (4B & 4E) and their allotetraploid FLHORAG1 (4C & 4F). (●: diploid / control condition ; ○: diploid / stress condition ; ▼: tetraploid / control condition ; ▽: tetraploid / stress condition). Vertical bars indicate the mean value ($n=2$) $\pm$ SE.

Figure 3: Organization of genetic diversity based on profile of expression of contrasted transcript derived fragments obtained on cDNA-AFLP gels. The tree was constructed according to the neighbour-joining method using a Dice matrix of dissimilarity.

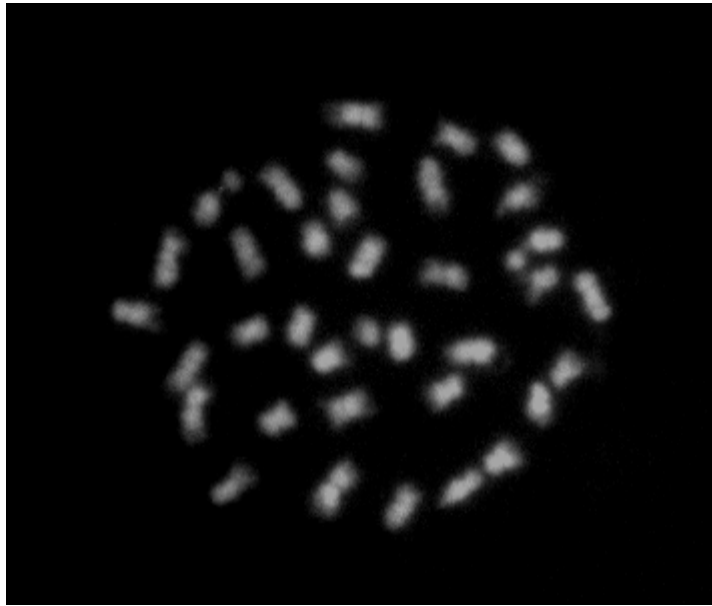


Fig. 1

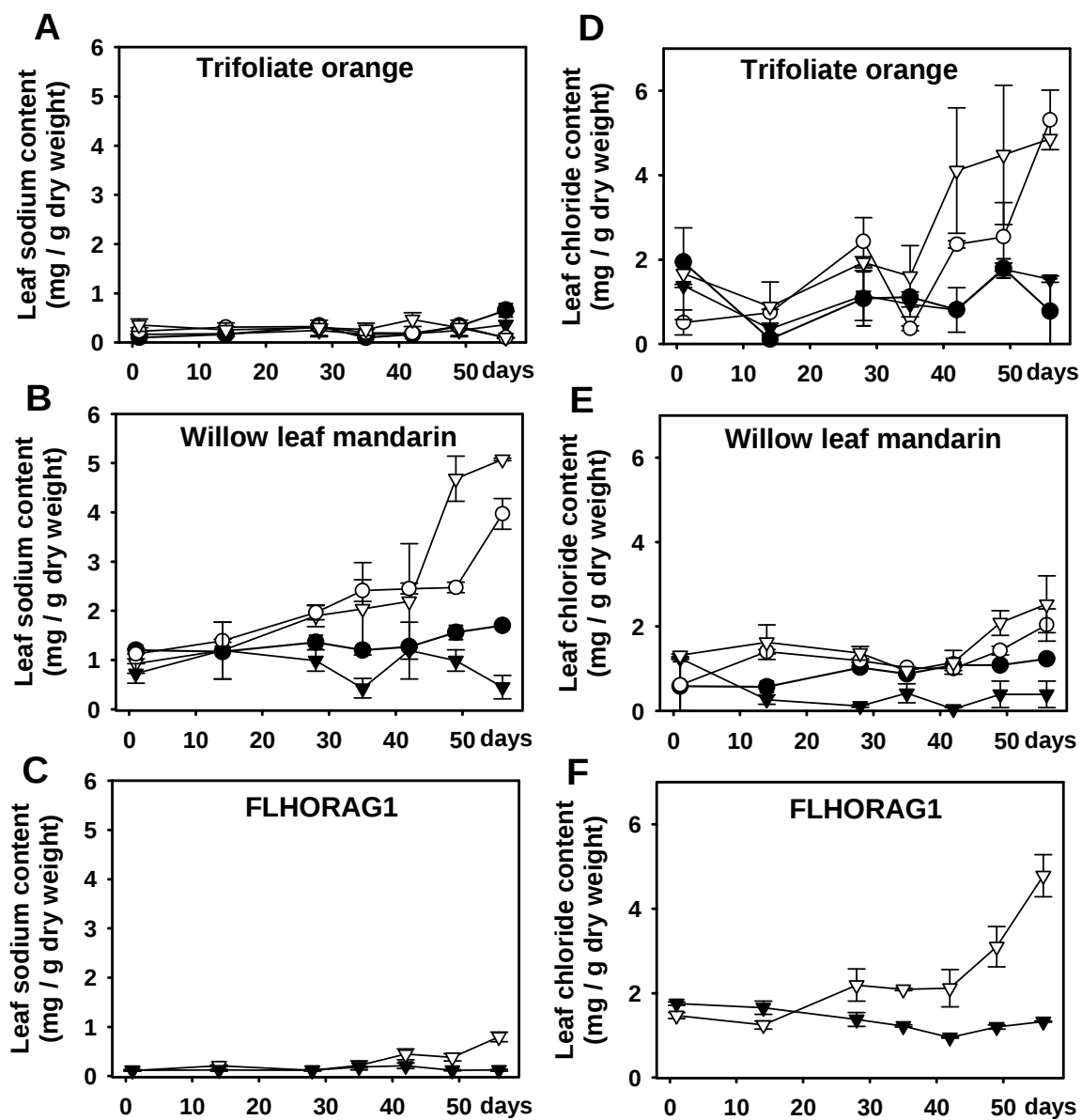


Fig. 2

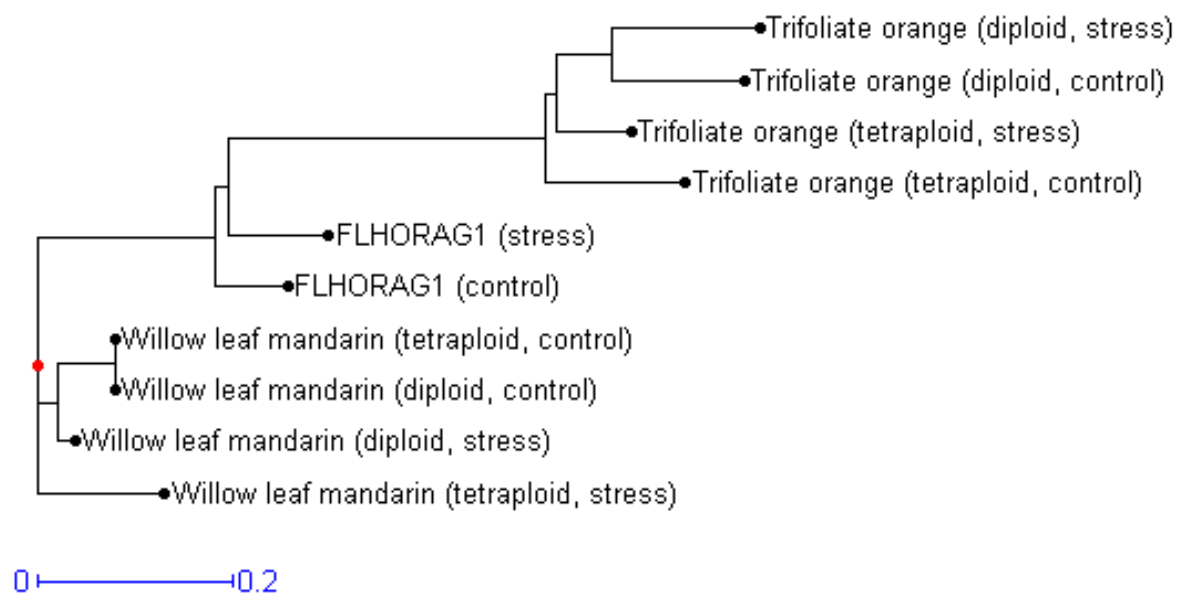


Fig. 3

Tables

Table 1. Nuclear SSRs markers useful for the allotetraploid FLHORAG1 characterization. Numbers presented in the table correspond to the band size obtained for each genotype. *SSR markers defined in this paper. ^bSSR marker used for analysing of the genetic conformity of the seedling.

SSRs markers			Genotypes		
Primer name	Primers sequence (5'→ 3')	Ta (°C)	Trifoliate orange	Willow leaf mandarin	FLHORAG1
Ci01C07	Froelicher et al 2008	55	272	258/260	258/260/272
Ci02A04	Froelicher et al 2008	55	180	184	180/184
Ci02B07	Froelicher et al 2008	50	184	178/186	178/186/184
Ci02C09	Froelicher et al 2008	50	253	269	253/269
Ci02F03	Froelicher et al 2008	55	174	186	174/186
Ci07C07	Froelicher et al 2008	50	225	243/255	225/243/255
Ci07D06	Froelicher et al 2007	55	161	179/187	161/179/187
Ci07E06	Froelicher et al 2008	55	256	244	244/256
mCrCIR01D06a	Froelicher et al 2008	50	244	248/250	244/248/250
mCrCIR01F04a ^b	Froelicher et al 2008	55	200/206	214/218	200/206/214/218
mCrCIR01F08a	Froelicher et al 2008	50	32	136	132/136
mCrCIR02A01*	F : TAAATGGTGACTGGTGAG	55			
	R : GCTTATGGATTGCGTT		312	304	312/304
mCrCIR02B11*	F : GTATTTGGCGTGATGAA	55			
	R : CAAAGTAAATAGGGTGTGAG		247	256/264	247/256/264
mCrCIR02D03* ^b	F : CAGACAACAGAAAACCAA	55			
	R : GACCATTTTCCACTCAA		292/312	296/312	292/296/312
mCrCIR02D04b*	F : CTCTCTTTCCCCATTAGA	50			
	R : AGCAAACCCACAAAC		211/213	215/244	211/213/215/244
mCrCIR02D11*	F : GAGTTGACCGAGAAGATT	55			
	R : TGAGTTTCAGTAAGTGTATGAG		192	218/220	192/218/220
mCrCIR02E02a*	F : AGTGAGAAAGACTGGTGTG	50			
	R : ACTTTCCCCATTTTGAT		220/222	210/220	210/220/222
mCrCIR02E08*	F : GGTTTGTGGGAGGTG	50			
	R : TGATTAGCATGTTGCG		316	276/284	276/284/316
mCrCIR02G02*	F : CAATAAGAAAACGCAGG	55			
	R : RTGGTAGAGAAACAGAGGTG		130/134	136/140	130/134/136/140
mCrCIR02G08*	F : CATGCAATGTTCCACTT	50			
	R : AGGCAGTTGTTAGACCC		250	260	250/260
mCrCIR02G12* ^b	F : AAACCGAAATACAAGAGTG	55			
	R : TCCACAAACAATACAACG		278	266	266/278

	F : CGTCCATCTAAGTGACC	55			
mCrCIR03F09*	R : TTTAACCTTCAGTAGAAACC		158	176	158/176
	F : GGACATAGTGAGAAGTTGG	55			
mCrCIR04H06*	R : CAAAGTGGTGAAACCTG		202	208/214	202/208/214
	F : ATACCTGTGAGCGTGAG	55	146/165	156/160	146/156/160/165
mCrCIR05A05* ^b	R : CCTCTTCCCTTCCATT				
	F : TCAACATTCCTTACCAGA	55			
mCrCIR05D11*	R : ATCATTCTCACTGCACC		268	248	248/268
mCrCIR06B05	Froelicher et al 2008	55	0	222/244	222/244
mCrCIR07B05	Froelicher et al 2008	50	216	222/266	216/222/266
mCrCIR07D07	Froelicher et al 2008	55	216	222	216/222
mCrCIR07E05 ^b	Froelicher et al 2008	50	146/148	136/138	136/138/146/148
mCrCIR07G11	Froelicher et al 2008	50	214/220	220/226	214/220/226
MEST0010	Luro et al 2008	55	178	168/170	168/170/178
MEST0817	Luro et al 2008	55	146	172/196	242/252/254

Ta, annealing temperature.

Table 2. Chloroplast and mitochondrial parental origins of the allotetraploid FLHORAG1. Three SSRs markers (ccmp3, ccmp6' and NTCP9') were used for the chloroplastic analysis and three PCR markers (*nad7/1-2* and *nad5/2-1*) were used for the mitochondrial analysis. Numbers in the table correspond to the band size obtained for each genotype.

Genotypes	SSRs chloroplastic markers			Mitochondrial markers	
	ccmp3	ccmp6'	NTCP9'	<i>nad7/1-2</i>	<i>nad5/2-1</i>
Willow leaf mandarin	104	127	255	152	220
Trifoliate orange	103	139	254	132	210
FLHORAG1	103	139	254	152	220

Table 3. Leaf chlorophyll content, leaf thickness, stomatal size and growth rate of diploids and tetraploids of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and their allotetraploid, the FLHORAG1. Values (mean value $\pm$ SE) with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

	Trifoliate orange		Willow leaf mandarin		FLHORAG1
	diploid	tetraploid	diploid	Tetraploid	tetraploid
Chlorophyll content (SPAD unit)	55.2 $\pm$ 0.7 A	63.1 $\pm$ 0.6 b	34.2 $\pm$ 0.6 C	54.2 $\pm$ 1.3 A	62.8 $\pm$ 0.9 b
Leaf thickness (mm)	0.273 $\pm$ 0.007 A	0.341 $\pm$ 0.010 b	0.267 $\pm$ 0.009 a	0.310 $\pm$ 0.013 B	0.339 $\pm$ 0.009 b
Stomata size (length $\times$ width, μm^{-2})	384 $\pm$ 13 A	583 $\pm$ 20 b	295 $\pm$ 11 c	540 $\pm$ 23 B	584 $\pm$ 18 b
Growth rate					
Slope value / r^2	0.32 / 0.99	0.20 / 0.97	0.15 / 0.99	0.11 / 0.98	0.24 / 0.99

Table 4. Molecular characterization of contrasted transcript derived fragments (TDFs) obtained by cDNA-AFLP.

TO: Trifoliate orange, WLM: Willow Leaf Mandarin, 2X: diploid, 4X: tetraploid, C: control condition, S salt stress condition

TDFs	cDNA-AFLP patterns ^a										Corresponding protein	E value ^b	General sequence similarity ^c	Accession number	Citrus sequence similarity ^d
	TO2X		TO4X		WLM2X		WLM4X		FLHORAG1						
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S					
1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Protein arginine N-methyltransferase protein	1.e ⁻⁶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_100365	<i>Poncirus trifoliata</i>
2	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	Choline monooxygenase	2.e ⁻⁷	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_119135	<i>Citrus sinensis</i>
3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Group 5 late embryogenesis abundant protein	6.e ⁻³³	<i>Citrus unshiu</i>	DQ424891	<i>Citrus unshiu</i>
4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Kelch repeat-containing Serine/threonine phosphoesterase	1.e ⁻¹¹¹	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT2G27210	<i>Citrus reticulata</i>
5	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Serine/threonine kinase	1.e ⁻⁵	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_102350	-
6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Putative mitochondrial processing peptidase beta subunit	2.e ⁻⁶³	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AK226251	<i>Poncirus trifoliata</i>
7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Amino acid permease 1 (amino acid transporter)	4.e ⁻⁴⁸	<i>Nicotiana sylvestris</i>	AT5G41800	<i>Citrus sinensis</i>
8	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	65 kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A	8.e ⁻²¹	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_113479	<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>
9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Inorganic pyrophosphorylase 1	3.e ⁻⁴²	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_099987	<i>Citrus sinensis</i>
10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Zinc finger protein (C3HC4-type Ring finger)	2.e ⁻¹⁰	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_125268	<i>Citrus x paradisi</i>
11	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	5'-AMP-activated protein kinase beta-1 subunit-related	2.e ⁻³⁹	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_123342	<i>Citrus sinensis</i>
12	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	23kDa polypeptide of the oxygen-evolving complex of photosystem II	2.e ⁻¹⁴	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT1G06680	<i>Poncirus trifoliata</i>
13	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Unannotated protein	5.e ⁻⁸⁸	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AT5G45410	<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>

^a, + Transcript present ; - Transcript absent ; ^b, Similarity was significant for E values < 1.e⁻⁵ ; ^c, Similarity was checked using the BLAST program of NCBI ; ^d, Similarity was checked using the BLAST program on citrus database (high similarity, E values = 0)

2. Article 2

La tolérance au stress salin chez les porte-greffe d'agrumes tétraploïdes dépend du déficit hydrique : sans déficit hydrique, les porte-greffe d'agrumes tétraploïdes ne sont pas plus tolérants au stress salin que les diploïdes.

Présentation de l'article 2

Comme nous avons pu le voir dans l'article 1, la réponse du Poncirus (sensible au sel), du mandarinier commun (tolérant au stress), des autotétraploïdes respectifs et de l'hybride allotétraploïde FLHORAG1 à un stress salin modéré peuvent être très différentes. Dans ces conditions, l'accumulation des ions chlorures ou sodium au niveau des feuilles n'induit pas forcément de symptômes de chlorose.

Nous avons voulu vérifier si les résultats obtenus en condition de stress salin modéré étaient également applicables aux situations de fortes contraintes salines. Pour cela, nous avons arrosé chaque jour les plants avec une solution salée afin de s'affranchir autant que possible de la composante déficit hydrique du stress salin. L'expérimentation a duré 8 semaines et les concentrations en sel appliquées ont été augmentées progressivement (de 50mM à 400mM en NaCl).

Au cours de ces 8 semaines de stress salin, différents paramètres ont été mesurés dans le but de caractériser autant que faire se peut, les propriétés de tolérance des différents génotypes diploïdes, autotétraploïdes, et allotétraploïdes. La mesure de la fluorescence chlorophyllienne $[(F_m - F_0)/F_m]$ des feuilles a été étudiée tout au long du stress. De même, nous avons mesuré les contenus en eau, en chlorures et en sodium foliaires ainsi que l'épaisseur des feuilles. A la fin du stress, les contenus racinaires en ions chlorures et sodium ont également été dosés. En se basant sur les résultats physiologiques obtenus $[(F_m - F_0)/F_m]$ et concentrations en ions, nous avons choisi la 7^{ème} semaine de stress comme la date la plus pertinente pour étudier l'expression de gènes

candidats impliqués dans la tolérance au sel chez les génotypes diploïdes, autotétraploïdes et allotétraploïdes.

Différents gènes candidats identifiés au cours de notre travail présenté dans l'article 1 ont été étudiés. D'autres gènes candidats impliqués dans la réponse au stress salin ont également été étudiés. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux gènes impliqués dans :

- (1) la transduction du signal et la régulation de la transcription (*SOS3*, *PAM1*, zinc finger protein, *Myb8*)
- (2) la synthèse de l'ABA (*NCED1*),
- (3) le transport des ions sodium et chlorures (*cNHX1*, *SOS1*, *CCC12Ac*),
- (4) la synthèse des osmotocums : glycine-bétaïne (*CMO*) et proline (*P5CS*),
- (5) la protection des macromolécules (*cLEA5*),
- (6) la détoxification cellulaire des ROS (*CAT2* et *GR*).

Les modalités d'application du stress (stress salin sans limitation en eau) avaient pour but de limiter au maximum l'application d'un déficit hydrique. La composante majeure du stress salin appliquée était donc une composante ionique. Au cours de ce second travail, nous avons observé que l'ensemble des génotypes accumulaient de fortes concentrations en ions chlorures et sodium, les tétraploïdes accumulant davantage que les génotypes diploïdes. Il est probable que le flux de transpiration ait été peu affecté, du moins au début du stress, pour l'ensemble des génotypes. Par la même, le maintien d'un flux de transpiration important pourrait être à l'origine des très fortes concentrations en ions sodium et chlorures mesurées dans les feuilles. En effet, il est admis que le transport des ces ions des racines vers les feuilles se fait dans le flux de transpiration. Au niveau moléculaire, l'étude de l'expression des ARNm des différents gènes candidats impliqués dans la tolérance au sel, renforce cette hypothèse. En effet, les génotypes les plus sensibles présentent des expressions supérieures à celles des génotypes les plus tolérants (gènes codant pour des transporteurs ioniques ou des enzymes de synthèse des osmotocums). De même, le génotype le plus sensible (le mandarinier Willow leaf autotétraploïde) est le seul à induire très fortement les

gènes *NCED1* et GR impliqués respectivement dans la synthèse de l'ABA médiant la régulation de l'état d'ouverture des stomates, et la détoxification cellulaire.

L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'en l'absence de déficit hydrique au cours d'un stress salin, la fermeture des stomates reste limitée, les ions chlorures et sodium étant accumulés de façon importante dans les feuilles de l'ensemble des génotypes. L'anatomie et la morphologie particulières des tétraploïdes pourrait être à l'origine de la plus forte accumulation observée chez ces génotypes par rapport aux génotypes diploïdes.

Salt stress tolerance of tetraploid citrus rootstocks is dependant of water shortage

Wafa Mouhaya¹, Thierry Allario¹, Fernando Andrés², José Manuel Colmenero-Flores², Manuel Talon², Patrick Ollitrault¹ and Raphaël Morillon^{1*}

Keywords: citrus, polyploidy, rootstocks, salt stress

¹Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UPR amélioration génétique des espèces à multiplication végétative. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

²Centro de Genomica, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 46113 - Moncada – Valencia, Spain.

*Author to whom correspondence should be addressed. UPR amélioration génétique des espèces à multiplication vegetative du CIRAD, Centro de Genomica, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) 46113 - Moncada - Valencia Spain. Phone: (00 34) 963 424 143 Fax: (00 34) 963 424 106. E-mail: raphael.morillon@cirad.fr

Abstract

In the Mediterranean basin, salinity and drought, but also calcareous soil and iron deficiency are the main abiotic constraints that face up the citrus trees. With climatic changes, providing rootstocks more tolerant to abiotic stress is then a priority. In this article, we investigated tolerance to high salinity constraint of one tetraploid rootstock genotype when compared to its respective diploid (trifoliate orange), one tetraploid variety when compared to its respective diploid (Willow leaf mandarin) and the allotetraploid rootstock (FLHORAG1) obtained from the protoplast fusion of trifoliate orange and Willow leaf mandarin. Plants were watered each day in order to apply a constant soil water potential, from 50 mM to 400 mM NaCl. Maximum quantum yield of PSII as well as the leaf and root chloride and sodium content were monitored. We observed that tetraploid plants were not more tolerant than their respective diploid. Indeed, chloride accumulation in leaves was greater in tetraploid when compared to diploid. The expression of several candidate genes such as genes involved in signal transduction, sodium and chloride transport, osmotic adjustment and regulation of the stomata opening, detoxification processes were investigated by real time RT-PCR. In our condition, a good correlation was observed between sensitivity to the stress and induction of genes involved in salt stress tolerance. In our hands, the application of a high salt stress concentration with no water limitation do not limit the transport of chloride and sodium to the leaves, tetraploid genotypes being more affected than diploids. Our results suggest that tetraploid genotypes are more sensitive to salt stress if no water limitation is associated to this salt stress.

Introduction

Citrus industry is confronted to many biotic and abiotic stresses. In order to cope with those stresses and to maintain fruit quality, citrus varieties are grown on rootstocks. To date, most of the rootstocks used belong to the *Citrus* and *Poncirus* genera, or to hybrids obtained between those two genera (Barrett, 1985). In the field, most of the rootstocks are clones from their mother tree because of partial apomixis. Indeed, the percentage of zygotic plants we obtained in seedlings of trifoliate orange and willow leaf mandarin was minor than 3% (Saleh et al., 2008 ; Mouhaya et al., submitted for publication).

Citrus rootstocks tolerance to salt stress has been investigated for decades. To date, damages caused by salinity in citrus trees were usually associated with chloride accumulation but not with sodium (Cooper, 1961 ; Bañuls et al., 1997 ; Moya et al., 2003). One strategy that has been developed to improve salt stress tolerance is to use rootstocks that limit the root chloride absorption and by the way limit the leaf chloride accumulation (Cooper et al., 1952 ; Bañuls and Primo-Millo, 1995). On one hand, *Poncirus trifoliata* and its hybrids were shown to be sodium-excluders (Elgazzar et al., 1965 ; Zekri and Parsons, 1992) and are known for their capability to accumulate chloride. On the other hand *Citrus* such as Cleopatra mandarin and Rangpur lime are known to be salt tolerant rootstocks and were shown to be chloride-excluders (Cooper, 1952 ; Zekri and Parsons, 1992). Mechanisms involved in sodium compartmentation out of the cytoplasm are well documented in *Arabidopsis* and citrus and many encoding genes for Na⁺ co-transporters and regulators such as *NHX1*, *SOS1*, *SOS2* and *SOS3* were characterized (Apse et al., 2003 ; Porat et al., 2004 ; Shi et al., 2003 ; Guo et al., 2004). However chloride uptake and associated transporters is still poorly documented. In citrus, Colmenero-Flores et al. (2007) characterized recently a chloride transporter involved in long-distance transport and development process. If chloride absorption is not limited at the root level, those ions will be translocated to the leaves throughout the transpiration stream where they will cause necrosis and even defoliation (Moya et al., 2003). When a salt stress occurs, other genes are also triggered such as encoding genes for transcription factors involved in signal transduction (zinc finger and Myb proteins) (Sakamoto et al., 2004 ; Dai et al., 2007), and genes involved in the biosynthesis of osmoticum such as choline monooxygenase (*CMO*) and Δ 1-pyrroline-5-carboxylate-synthetase (*P5CS*) (Subbarao et al., 2001 ; Liu and Zhu, 1997 ; Ueda et al., 2004) and chaperon proteins such as Group 5 Late Embryogenesis Abundant Protein (*LEA5*) (Moons et al., 1995 ; Naot et al., 1995).

Genes involved in ABA biosynthesis and then to stomata opening regulation such as *NCED* will also be triggered (Rodrigo et al., 2006). To end, genes coding enzymes involved in detoxification processes such as catalase and glutathione reductase will also be expressed in order to cope with ROS injuries (Davenport et al., 2004 ; Ferreira et al., 2004).

Most citrus (varieties and rootstocks) are diploid and only some natural polyploids such as *Fortunella hindsii*, Tahiti lime, and some citrus relatives were identified (Iwamasa et al., 1988).

Spontaneous tetraploid plants may arise in seedlings of apomictic genotypes, with a quite high frequency varying from 1 to 7% (Barret and Hutchinson, 1982 ; Saleh et al., 2008). Those plants are the result of a chromosome stock doubling of the nucellar tissues (Cameron and Soost, 1969), the rate of polyploid seedlings being dependant of physiological and environmental factors (Barrett and Hurtchinson, 1982). Polyploids present specific behaviour such smaller tree size associated to lower rates of whole plant transpiration, thicker leaves or greater cell size (Romero-Aranda et al., 1997). Stomata size increases in the meantime of the polyploidy status while the stomata density is decreased (Romero-Aranda et al., 1997). As well, the number of chloroplasts per cell and chlorophyll is increased in tetraploids when compared to diploids (Jellings and Leech, 1984 ; Warner et al., 1987). In 1980, Franck investigated wheatgrass polyploid tolerance to water deficit. According to this author who studied the photosynthesis activity in control and water deficit conditions, hexaploid and tetraploid presented greater traits of tolerance associated to higher capacity of fixing CO₂. In a more recent study, Xiong et al. (2006) showed that hexaploid wheat lines were more tolerant to water deficit than tetraploids, those last genotypes being more tolerant than diploid. Indeed, when submitted to water deficit (progressive decrease of the soil water content), hexaploids were the first to decrease their stomata conductance when compared to tetraploids and to diploids. In the meantime, polyploids (hexaploid and tetraploids) were able to maintain longer a constant leaf relative water content than diploid (Xiong et al., 2006). In polyploids, it is then possible that the increase of the cell volume and the number of chloroplasts per cell is a way to maintain higher rates of photosynthesis (Jellings and Leech, 1984 ; Warner et al., 1987). In ligneous plants, higher traits of tolerance to water deficit were also reported for tetraploid, pentaploid and hexaploid such as plum tree and paper birch relatively to their respective diploids (Puttovoitova et al., 1996 ; Li et al., 1996).

Polyploid genome expression in non stress condition has been tremendously investigated this last decade. In allopolyploid, numerous changes such as chromosomal rearrangement and change in

gene expression may occur (Song et al., 1995 ; Feldman et al., 1997 ; Comai et al., 2000 ; Wang et al., 2006). Recently we investigated citrus autotetraploid and allotetraploid rootstocks for salt stress tolerance when compared to their respective diploid parents (Saleh et al., 2008 ; Mouhaya et al., submitted for publication). Autotetraploid but also allotetraploid rootstocks were observed to be more tolerant to salt stress than their respective diploid. However, the molecular determinisms of the greater tolerance to salt of those polyploids remained elusive because it is still difficult to separate mechanisms that regulate the expression of polyploid genomes and those specific to each diploid genotype that may lead to a higher salt stress tolerance. Indeed, cDNA-AFLP methodology revealed that genes expression profile of autotetraploid plants trifoliate orange and Willow leaf mandarin were most of the time similar to their respective diploid. However, gene expression pattern of the allotetraploid FLHORAG1 (obtained by somatic protoplast fusion between trifoliate orange and Willow leaf mandarin) was similar to one of its two parents depending of the studied gene (Mouhaya et al., submitted for publication)

In this work, we investigated the allotetraploid rootstock FLHORAG1 (Mouhaya et al., submitted for publication), with its two diploid parents, trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) and willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa*) and their respective autotetraploids in high salinity conditions. Plants were watered each day at the field capacity in order to get a water potential dependent of the saline solution. Maximum quantum yield of PSII $[(F_m - F_0)/F_m]$, chloride and sodium contents were determined in order to characterize the salt stress sensitivity of all the studied genotypes. We then investigated the transcriptional level of several genes we identified recently using cDNA-AFLP methodology (Mouhaya et al., submitted for publication) and of some candidate genes known to be expressed in salt stress condition. Our results suggest that in high salt stress conditions without water limitation, autotetraploids and the allotetraploids are not more tolerant than diploid. We propose that water shortage that may occur during a salt stress, will lead to a more efficient stomata regulation in tetraploid when compared to the respective diploid, which could limit chloride and sodium absorption and accumulation.

Materials and methods

Plant material

Seedlings were provided by the INRA-CIRAD station of Corsica, France. Diploid and autotetraploid seedlings of Willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa*, SRA133) and trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) cv. Pomeroy, SRA 1074) as well as their allotetraploid somatic hybrid FLHORAG1 (Ollitrault et al., 2000) were grown for 6 months in greenhouse. Identification of autotetraploid plants among diploids and diploid genetic conformity checking (nucellar status of the plants) were performed according to Mouhaya et al. (submitted for publication) using the same SSRs markers.

Twelve diploid and tetraploid plants of each genotype were then selected and transplanted on the same substrate in 3 L pots and grown in greenhouse. Plants were irrigated twice a week with half diluted nutritive solution [fertilizer 28-14-14 (ref 205), Fertile, France]. At one year, plants were pruned in order to homogenize the plant size of diploids and tetraploids.

Salt stress experiment

For each genotype, 5 two-years-old plants were selected for each condition. Salt stress was applied by watering plants daily at the same hour, either with 0.5L water supplemented with half diluted nutritive solution for control plants, or with 0.5L water supplemented with half diluted nutritive solution and 50 mM of NaCl for 2 weeks, then 100 mM for 2 weeks, then 200 mM for 2 weeks, and finally 400 mM for the last 2 weeks. By watering plants daily, pots were at the field capacity and the water potential was expected to be mostly dependent of the salt solution that was applied. Experiments were performed during the summer in greenhouse in the following conditions: photoperiod (16/8), temperature (30 to 35°C) and relative humidity (60 to 85%).

Leaf water content, leaf thickness and maximum quantum yield of PSII analysis

Leaf water content was monitored along the salt stress experiment at the same hour of the day: five leaves per genotype were harvested and fresh and dry weights were measured. Prior to be dried, leaf thickness of each genotype was measured by using a micrometer (Mitutoyo, IP65, Japan). Dry leaves were used for mineral analysis. Maximum quantum yield of PSII, ($F_m - F_0 / F_m$) was monitored along the same period by using a fluorescence meter (Hansatech Ltd, Kings Lynn, UK). Maximum quantum yield of PSII was measured on three leaves of each genotype.

Mineral analysis: sodium and chloride content

Leaf samplings were performed along the stress experiment and root samplings were harvested at the end of the stress, for chloride and sodium content analysis. Those fractions were oven-dried at 60°C for one week, weighed, crushed in hammer-mill and stored at room temperature. Sodium and chloride analyses were carried out on dried leaves and roots according to Saleh et al. (2008). For leaves, sodium and chloride contents were expressed in $\mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ (taking account of leaf area and thickness) and in $\text{mg}.\text{g}^{-1}$ of dry material for roots. ICP assays were performed at the US49, CIRAD-PERSYST in Montpellier, France.

Gene expression: Real time RT-PCR analysis

Samplings for gene expression analysis were regularly performed (7-days, 21-d, 35-d, 49-d, 56-d). Each sampling was a mix of leaves from four trees. Samplings were kept at minus 80°C.

Total RNA were extracted from leaves collected after seven weeks (49-d) of the salt treatment according to Chomczynski and Sacchi (1987). Triplicate assays were performed on two independently collected leaves. Total RNA were purified using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Leusden, The Netherlands) including an RNase free-DNase treatment using RNase free-DNase set (Qiagen, Leusden, The Netherlands). The total RNA concentration was measured at 260 nm and checked with RiboGreen RNA Quantitation Reagent and kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) using FLUOstar Galaxy fluorometer (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany). Retrotranscription and Real time RT-PCR were performed together using the LightCycler 2.0 instrument (Roche, Diagnostics GmbH, Germany). Standard curves were done for all studied genes. To obtain standard curves, real time PCR was performed on dilutions of cDNA obtained by retrotranscription of 100 ng of a given RNA sample.

2.5 μL of DNase-treated total RNA (20ng/ μL) were used in 10 μL reactions containing 2 μL of vial1 PCR mix (LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I), 0.25 μM gene-specific primers (Table 3), 2.5 units of SuperScript II Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), 1 unit of RNase Inhibitor (Applied Biosystems). PCRs were conducted by the following steps: a first step of retro-transcription at 48°C for 30min followed by a temperature program strating with 10min at 95°C then 45 cycles consisting of 2s at 95°C, 10s at primer annealing temperature and 15s at 72°C, and finally the melting temperature 42s at 95°C. Internal control (a reproducible point in the gene-specific standard curve) and negative control (without RNA) were included for each PCR.

The primers that were used in real time RT-PCR (Table 3) were defined using the software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) to select primer pairs with minimal number of potential primer dimers and primer hairpins as possible.

Statistical analysis

Data are expressed by the mean value $\pm$ SE. We used SIGMASTAT from SPSS (Chicago; www.spss.com_software_science) to analyze the data. The *t* test and ANOVA test were used to detect differences between the genotypes and the growing conditions at the usual probability level of $P = 0.05$.

Results

Tetraploid obtaining and genetic constitution analysis and plant growth

Using flow cytometry, tetraploids were screened among plantlets from mother trees of the San Guiliano germplasm among the same set of plantlets than in Mouhaya et al. (submitted for publication). Removal of zygotic plants was as well performed according to Mouhaya et al. (submitted for publication). Only nucellar plants were kept for salt stress investigations. At one year, tetraploid plants were smaller than diploids. Plants were pruned in order to homogenise them. 10 two-years-old homogeneous plants of each genotype were selected for salt stress experiment.

Salt stress

Phenotyping of polyploids when confronted to high salt stress condition

Experiment was conducted in greenhouse during the spring. Two years-old diploid and tetraploid plants of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and FLHORAG1 were submitted to a progressive increasing salt stress for 56 days (from 50 mM to 400 mM). Plants were watered each day with 0.5L of solution in order to maintain pots at the field capacity. 0.5L was sufficient to get leaching from the pot of the exceeding solution. Leaf thickness and leaf water content was measured for control and stressed plants along the experiment. Along the experiment, the leaf water content of each genotype in control condition did not change up to 2% and was not significantly different (data not shown). On Table 1 are presented the leaf thickness and the leaf water content in control and stressed plants measured the 49th day of the experiment. In control condition, tetraploid plants clearly presented greater leaf water contents and thicker leaves when compared to the respective diploids. After 49 days of stress, for all the genotypes, values of leaf water content and leaf thickness were the same or increased when compared to control conditions suggesting that no water limitation occurred. At the end of the experiment, Willow leaf genotypes presented symptoms of chlorosis and also trifoliate orange genotypes to a lesser degree but not FLHORAG1. Only, Willow leaf genotypes presented leaf fall. Symptoms of chlorosis and leaf fall were greater for tetraploids when compared to diploids. Monitoring of the Maximum quantum yield of PSII, $(F_m - F_0)/F_m$, along the stress (Fig. 1) clearly showed that trifoliate orange and FLHORAG1 genotypes were slightly affected by the stress, no significant difference being observed in between diploids and tetraploids. However, at the 49th stress day, tetraploid

mandarins were the most affected, $(F_m - F_0)/F_m$ being reduced of 50% when compared to diploid. Ion contents were monitored weekly for leaf samplings. An increase of chloride content when compared to control plants was observed after 35 days of stress. Taking account of the surface and the thickness of leaves for each genotype, diploid trifoliolate orange presented the lower leaf chloride contents whereas tetraploid Willow leaf presented very large chloride contents. In any case, autotetraploids presented higher chloride content than their respective diploids. FLHORAG1 presented chloride contents similar to tetraploid trifoliolate orange and diploid willow leaf. Leaf sodium content was investigated only the last day of the stress (Fig. 2). Trifoliolate orange genotypes, diploid mandarin and FLHORAG1 accumulated almost the same contents of sodium. Only the tetraploid mandarin accumulated sodium at high level. The ultimate day of the stress, root chloride and sodium contents were investigated (Fig. 3). If a significant increase of the root chloride content was observed between control and stress conditions for trifoliolate orange genotypes and FLHORAG1, no change was observed for mandarin genotypes (Fig. 3A). Concerning root sodium contents, significant increases were observed overall the genotypes, FLHORAG1 and trifoliolate orange accumulating the most (Fig. 3B). Analysis of the sodium/chloride content ratios in the leaves shown that the content of sodium and chloride were very close (ratios close to 1), whatever the studied genotype. However, 2.7 to 3.6 fold more sodium than chloride were found in roots (Table 2). Interestingly, in trifoliolate orange and mandarin genotypes, the leaf/root ratio of sodium and chloride were highly increased for autotetraploids when compared to diploids. FLHORAG1 presented sodium and chloride leaf/root ratios similar to its trifoliolate orange diploid parent.

Gene expression in diploid and tetraploid genotypes when confronted to high salt stress condition

After 49 days of stress, a significant increase in chloride leaf content was observed for trifoliolate orange and Willow leaf genotypes as well for FLHORAG1 when compared to controls. We choose this date for genes expression analysis assuming that mechanisms for salt stress tolerance were triggered. RNA were prepared and gene expression was carried out by real time RT-PCR: 4 genes we identified previously to be up or down regulated in stress condition depending of the genotypes or the ploidy status (Mouhaya et al., submitted for publication), and 9 candidate genes known to be induced by salt stress. The names of the genes and the sequences of the primers we used to monitor the gene expression by real time RT-PCR are presented in Table 3. First, we

investigated the expression of encoding genes for transcription factors, *PAM1*, *RZFP* and *MYB8*, involved in salt stress signal transduction (Fig. 4). *PAM1* expression was shown not to be modified by the stress whatever the genotypes studied. FLHORAG1 inherited low expression profile similar to its trifoliate orange parent (Fig. 4A). *RZFP* was clearly up regulated by the stress only in FLHORAG1 (Fig. 4B). *MYB8* was shown to be up regulated by the stress only in mandarin genotypes and FLHORAG1 (Fig. 4C). Transcriptional level of encoding genes for SOS3 Ca^{2+} sensor, and sodium and chloride transporter such as *SOS1*, *cNHX1* and *CCC12Ac* was also monitored (Fig. 5). SOS3 that interact physically with SOS2 and activates SOS1 Na^+/H^+ antiport activity was up-regulated in mandarin genotypes and FLHORAG1. Interestingly the greater up-regulation was observed for tetraploid mandarin that was more physiologically affected by the salt stress (Fig. 5A). *SOS1* and *cNHX1* were clearly up-regulated by the stress in Willow leaf genotypes and FLHORAG1 (Fig. 5B & C). *CCC12Ac* was up-regulated overall the genotypes except in diploid trifoliate orange (Fig. 5D). Encoding genes for enzymes such as CMO and P5CS involved respectively in biosynthesis of glycine-betaine and proline, or genes coding for cLEA5 were also studied (Fig. 6A, B & C). *CMO* was poorly expressed in trifoliate orange genotypes and highly expressed in mandarin genotypes. Stressed FLHORAG1 was the only genotype that presented an up-regulation of *CMO* transcription (Fig. 6A). *P5CS* was up-regulated in almost all the genotypes but not in diploid trifoliate orange. *cLEA5* was almost not expressed in trifoliate orange genotypes while this gene was highly induced in stressed mandarin genotypes (Fig. 6B & C). In order to complete the overview of salt stress response, *NCED*, a gene involved in biosynthesis pathway of ABA was investigated (Fig. 6D). If this gene was up regulated overall the genotypes, a much greater up-regulation was observed in mandarin genotypes and FLHORAG1. To end, transcriptional level of encoding genes for detoxification enzymes catalase 1 and 2 and glutathione reductase were also studied. *CAT2* was shown to be down-regulated by the stress in almost the genotypes except FLHORAG1 which maintained its control transcriptional level. *GR* was dramatically up-regulated only in tetraploid mandarin.

Discussion

In a recent study, we observed that tetraploid rootstocks are more tolerant to salt stress than their respective diploids (Saleh et al., 2008 ; Mouhaya et al., submitted for publication). We observed that when confronted to salt stress, tetraploid never present symptom of chlorosis as it is possible for some sensitive diploid genotypes. As well we observed that gene expression profiles of autotetraploids were very similar to their respective diploids. Moreover, depending on the studied gene, allotetraploid inherited a gene expression profile similar to one of its two parents.

In this article, we investigated two autotetraploids genotypes when compared to their respective diploids and their allotetraploid in high salt stress conditions. By real time RT-PCR we monitored candidate gene expression in order to characterize molecular determinants of salt stress tolerance in tetraploids.

Physiological tolerance of diploid, autotetraploid and allotetraploid plants when confronted to high salt stress conditions.

In order to try to induce phenotypes between diploid and tetraploid of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and FLHORAG1, overall genotypes were submitted to a progressive increasing salt stress. Plants were watered each day at the field capacity in order to impose a water potential as much as possible dependent on the saline solution. At the end of the stress, plants were submitted to a very high salt stress concentration (400 mM of NaCl). Symptom of chlorosis were observed for Willow leaf and trifoliate orange genotypes and leaf fall only for Willow leaf genotypes, autotetraploids being more affected the respective diploids. Leaf thickness and leaf water content in control and stress conditions were investigated (Table 1). In control condition, leaves of tetraploid were thicker and tetraploid leaf water contents were higher than for diploid. Monitoring of the maximum quantum yield of PSII showed that trifoliate orange and FLHORAG1 photosynthetic activities were slightly affected by the stress (Fig. 1). On the contrary, mandarin genotypes that were supposed to be more tolerant than trifoliate orange genotypes presented at the end of the stress a much lower $(F_m - F_0)/F_m$. In the literature, chloride ion is supposed to be the responsible of salt sensitivity in citrus (Romero-Aranda et al., 1998). It is clear that tetraploid Willow leaf genotype that presented a PSII efficiency that was the much affected presented also the greater foliar accumulations of chloride and greater phenotypes of salt stress (chlorosis and leaf fall). It is interesting to note that the leaf chloride content in tetraploid

mandarin after 56 days of stress, $27.2 \pm 6.0 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ corresponded to an equivalent of $68.6 \pm 14.7 \text{ mg}.\text{g}^{-1} \text{ DW}$. The accumulation was then, more than ten fold greater than in a soft salt stress as reported by Mouhaya et al (submitted for publication). We can also observe that the chloride accumulations of trifoliolate orange genotypes and FLHORAG1 that were much greater in high salt stress condition than in soft salt stress condition (around six fold greater than results presented by Mouhaya et al (submitted for publication) were lower than for tetraploid Willow leaf genotype. At the end of the stress, leaf sodium contents were similar for almost all the stressed genotypes except tetraploid mandarin that accumulated much more sodium: a value of $24.7 \pm 5.3 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ corresponded to an equivalent of $62.9 \pm 5.3 \text{ mg}.\text{g}^{-1} \text{ DW}$. This value was more than ten fold greater than in soft salt stress condition (Mouhaya et al., submitted for publication). At the end of the stress, leaf sodium content of diploid trifoliolate orange grown in salt stress condition was $5.3 \pm 0.4 \mu\text{g}.\text{mm}^{-3}$ (equivalent to $16.3 \pm 1.3 \text{ mg}.\text{g}^{-1} \text{ DW}$), a quantity that was more than twenty fold more than in soft salt stress condition (Mouhaya et al., submitted for publication) suggesting that in such salt stress conditions, trifoliolate orange and the other genotypes are not anymore sodium excluder as it is proposed in the literature (Elgazzar et al., 1965 ; Zekri and Parsons, 1992). Analysis of chloride and sodium contents at the root level showed that trifoliolate orange genotypes and FLHORAG1 accumulated both more ions than mandarin genotypes did. In Mouhaya et al. (submitted for publication), we previously proposed that Willow leaf mandarin, which is genetically close related to Cleopatra mandarin, is also chloride-excluder (Cooper, 1961 ; Zekri and Parsons, 1992). Taking together, the results of the present study suggest that in high salt stress condition with no water limitation, Willow leaf mandarin genotypes did not limit their chloride and sodium pull up from the soil, and transferred directly the ions to leaves. Syvertsen et al. (2000) observed that citrus tetraploid rootstocks had lower rates of whole plant transpiration suggesting that the control of stomata conductance may be the most important factor controlling the growth of polyploids. We may suppose that the specific manner to impose the salt stress associated to the specific anatomy of tetraploids such the greater cell size and the greater leaf thickness (Li and al., 1996; Xiong et al., 2006; Mouhaya et al., submitted for publication) were the main criteria leading to higher ions accumulation in leaves of tetraploids. Indeed, the greater leaf thickness and the higher leaf water content observed in stress conditions for all the autotetraploid genotypes when compared to their respective diploid suggest that in our growing conditions, even if the water potential was put down due to the high salt stress concentration

applied, a transpiration stream was still occurring and a high rate of sodium and chloride was transferred to the leaves (Table 1).

Trifoliate orange tetraploids and the allotetraploid FLHORAG1 presented a greater leaf chloride and sodium accumulations than trifoliate orange diploids. The chloride and sodium leaf/root ratios were significantly increased in autotetraploid genotypes when compared to their respective diploids whereas ions leaf/root ratios of FLHORAG1 were very similar to diploid trifoliate orange suggesting that root ions accumulation for that genotype was preventing transport and accumulation of ions in the leaves (Table 2) and was limiting chlorosis and leaf fall. Under salt stress, trifoliate orange is known to have the particularity of fine root turnover which enables it to maintain a continuous root development, and thus to eliminate the excess of ions (Tozlu et al., 2000). We can suppose that FLHORAG1 has inherited this particularity of its parent trifoliate orange.

Gene expression in diploid and tetraploid genotypes when confronted to high salt stress condition

To monitor gene expression, we choose the 49th day of stress assuming that since the maximum quantum yield of PSII was severely altered and high chloride accumulations was observed in leaves of tetraploid Willow leaf mandarin, regulation of genome expression was triggered. We investigated 4 candidate genes that we characterized to be up or down regulated by salt stress (Mouhaya et al., submitted for publication). Profiles of gene expression we observed using real time RT-PCR were different of the ones we obtained by cDNA-AFLP (Mouhaya et al., submitted for publication) probably because plants did not have the same age and because salt stress conditions were very different. Among the three transcription factors we studied, RZFP and MYB8 presented clear gene expression induction by the stress in FLHORAG1 (RZFP) or in FLHORAG1 and mandarins (RZFP & MYB8), (Fig. 4B). In control condition gene expressions were usually similar between diploid and autotetraploid, the allotetraploid FLHORAG1 inheriting the gene expression profile of one of its two parents. Gene expression analyze of SOS3, SOS1, cHNX1 and CCC12Ac, clearly showed a perception of the salt stress by all the genotypes (Fig. 5). As expected, the diploid trifoliate orange that was physiologically slightly affected by the stress, presented the smaller transcriptional level of salt stress effectors while tetraploid mandarin that was severely affected physiologically by the stress presented the higher gene induction in order to translocate toxic ions outside the cytoplasm. However, genotypes that

were the most affected did not express more *CCCl2Ac*. In high salinity medium, it is possible that diffusive mechanisms through the apoplast may also constitute important pathways for Cl^- uptake in citrus plants as previously proposed (Moya et al., 2003).

Transcriptional levels of genes involved in osmoticum biosynthesis (*CMO*, *P5CS*) and *cLEA5* chaperon protein were also investigated. In stress condition, if *CMO* transcription was only induced in FLHORAG1, *cLEA5* was highly induced in mandarin genotypes while *P5CS* was up-regulated overall the genotypes except diploid trifoliate orange.

NCED gene expression profile showed an increase for all the genotypes, the larger change of expression being observed for mandarin genotypes ((Fig. 6D). *NCED* expression will lead to ABA biosynthesis and stomata closure. Moreover, ABA accumulation in leaves further to abiotic stresses or exogenous ABA application induced *P5CS* and *LEA* genes expression (Dure, 1993 ; Hudertmark and Hinch 2008). When *NCED* was slightly expressed in trifoliate orange no expression of *cLEA5* was observed. For mandarin genotypes and FLHORAG1 the expression of *cLEA5* was correlated to the transcriptional level of *NCED*.

This change of gene expression is in agreement with the dramatic decrease of the maximum quantum yield of PSII associated to high chloride contents observed in tetraploid mandarin. At high salinity (greater than 150 mM of NaCl), it has been reported that gene coding CAT2 was down regulated (Feierabend et al., 1992 ; Ferreira et al., 2004). As expected, genes coding for CAT2 were shown to be down-regulated. GR was dramatically up-regulated in tetraploid mandarin, the most affected genotype, (Fig. 7A & B) as shown by Davenport et al. (2004).

In our hands, in control condition, most of the difference of gene expression profile happened in allotetraploid while very limited changes were observed in autotetraploid genotypes as previously observed by Adams et al. (2004) and Wang et al. (2005). However, in stress condition, we may suppose that gene expression regulation mechanisms may occur in autotetraploid and allotetraploid, facilitating the plant adaptation to their environment.

At the end of the stress, we measured very large amounts of sodium and chloride in roots and leaves, associated with leaf chlorosis symptoms in Willow leaf genotypes and to a lesser degree in trifoliate orange genotypes but not in FLHORAG1. Leaf fall was observed only for Willow leaf genotypes. The high ions accumulations suggested that the transpiration flow was not limited along the stress and ions were highly transported and in the whole plant inducing leaf damages.

In those conditions, because of their specific anatomy, autotetraploid were disadvantaged when compared to their respective diploids. If a limitation of stomatal conductance would have occurred during a salt stress, we may have expected that the transport of toxic ions would have been more limited. However, those ions associated to the alteration of the photosynthesis and the synthesis of oxygen species will lead shortly to symptoms of chlorosis. To conclude, we may assume that in saline stress condition, better regulation of gas exchanges due to a water deficit associated to a better osmotic adjustment and a better efficiency to eliminate reactive oxygen species, may explain the usual greater tolerance to salt stress and water deficit observed in polyploids as it was described in diploid species (Du Plessis, 1985; Syvertsen and Levy, 2005; Mittler et al., 2004).

In order to confirm the interest of the use of polyploid rootstock for the citrus industry it will be required to test their water deficit tolerance. If that one is confirmed, we may assume that in the field in salt stress condition, a greater tolerance of polyploid will be observed since salt stress is most of the time associated with water limitations. As well, it would be also interesting to study autotetraploid rootstocks and allotetraploid genotypes such as FLHORAG1 when grafted to confirm the interest of tetraploid as a new source of rootstocks for the citrus industry.

Funding

Comité Mixte Inter Universitaire Franco-Marocain” (Programme Volubils, MA/05/137) to W M and European “INCO” project (FP6 – 2003 - INCO – DEV – 2 n° 015453) to T. A.

Interreg IIIA program, Proyectos de Investigación (Ministerio de Educacion y Ciencia, AGL 2007-65437-C04-01/AGR), European “INCO” project (FP6 – 2003 - INCO – DEV – 2 n° 015453).

Acknowledgements

We thank C. Jacquemond, F. Curk (Unité GEQA, INRA, San Giuliano, France) for providing diploid seedlings.

References

- Adams K.L., R. Percifield and J.F Wendel. 2004. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics*. 168 : 2217–2226
- Adams, K. L. and J. F. Wendel. 2005. Allele-specific, bi-directional silencing of an alcohol dehydrogenase gene in different organs of interspecific diploid cotton hybrids. *Genetics*. 171 : 2139-2142.
- Apse M. P., Aharon G. S., Snedden W. A. and Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science*. 285 : 1256-1258.
- Bañuls, J. and E. Primo-Millo. 1995. Effect of salinity on some citrus scion-rootstock combinations. *Ann. Bot.* 76 : 97-102.
- Bañuls J., Serna, M.D., M. Legaz and E. Primo-Millo. 1997. Growth and gas exchange parameters of citrus plants stressed with different salts. *J. Plant Phys.* 150 : 194-199.
- Barrett, H.C. 1985. Hybridization of citrus and related genera. *Fruit Varieties J.*, University Park, 39 : 11-16.
- Barrett, H.C. and D.J. Hutchinson. 1982. Occurrence of spontaneous octoploidy in apomictic seedlings of a tetraploid *Citrus* hybrid. *Proc. Int. Soc. Citric.* 1 : 29-30.
- Byrne, M.C., C.J. Nelson and D.D. Randall. 1981. Ploidy effects on anatomy and gas exchanges of tall fescue leaves. *Plant Physiol.* 68 : 891-893.
- Cameron, J.W. and R.K. Soost. 1969. Characters of new populations of *Citrus* polyploids, and

the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny, in: H.D. Chapman (Eds.), Proc. Int. Citric. Symp., University of California at Riverside 1 : 199–205.

Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162 : 156-9.

Colmenero-Flores J. M., Martinez G., Gamba G., Vazquez N., Iglesias D. J., Brumos J., Talon M. 2007. Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. Plant Journal. 50 : 278-292.

Comai L., Tyagi A. P., Winter K., Holmes-Davis R., Reynolds S. H., Stevens Y., and Byers B. 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed Arabidopsis allotetraploids. Plant Cell. 12 : 1551-1567.

Cooper W.C. 1961. Toxicity and accumulation of salt in citrus trees on various rootstocks in Texas. Proc. Fla State Hortic. Soc. 74 : 95-104.

Cooper W.C. and B. S. Gorton. 1952. Toxicity and accumulation of chloride salts in *citrus* on various rootstocks. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. 59 : 143-146.

Dai X., Xu Y., Ma Q., Xu W., Wang T., Xue Y., and Chong K. 2007. Overexpression of a R1R2R3 MYB Gene, OsMYB3R-2, Increases Tolerance to Freezing, Drought, and Salt Stress in Transgenic Arabidopsis. Plant Physiology Preview, DOI:10.1104/pp.106.094532.

Davenport S. V., Gallego S. M., Benavides M. P. and Tomaro M. L. 2004. Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. Plant Growth Regulation. 40 : 81-88.

Du Plessis, H.M. 1985. Evapotranspiration of citrus as affected by soil water deficit and soil salinity. Irr. Sci. 6 : 51-61.

Dure L. III. 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant dessication. Plant Journal, 3 : 363-369.

Elgazzar A., A. Wallace and N. Hemaïdan. 1965. Sodium distribution in rough lemon and trifoliate orange seedlings. Soil Sci. 99 : 387-391.

Feierabend J., Schaan C., Hertwig B. 1992. Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. Plant Physiology, 100 : 1554-1561.

- Feirrer A. L., Ferreira S., Duarte A. and Lima-Costa M. E. 2004. Antioxidative response to salt stress in different NaCl-tolerant citrus cell lines. *Proceedings of the International Society of Citriculture II*, 634-638.
- Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A. A. and Vega J. M. 1997. Rapid elimination of Low-Copy DNA sequences in polyploidy wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*. 147 : 1381-1387.
- Franck, A.B. 1980. Photosynthesis, transpiration and ribulose biphosphate carboxylase of selected creted wheatgrass plants. *Agron. J.* 72 : 213-316
- Guo Y., Qiu Q. S., Quintero F. J., Pardo J. M., Ohta M., Zhang C., Schumaker K. S., Zhua J. K. 2004. Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16 : 435-449.
- Hundertmark M. and Hinch D. K. 2008. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9 : 118.
- Iwamasa, M., Nito, N. and J.T. Ling, Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily, *Aurantioideae*, *Proc. Int. Citric. Cong.*, Goren and Mendel (Eds.), Philadelphia (1988) 123-130.
- Jellings, A.J. and R.M. Leech. 1984. Anatomical variation in first leaves on nine Triticum genotypes and its relationship to photosynthetic capacity. *New Phytol.* 96 : 371-382.
- Li, W.L., G.P. Berlyn and M.S Ashton. 1996. Polyploids and their structural and physiological characteristics relative to water deficit in *Betula papyrifera* (*Betulaceae*). *Am. J. Bot.* 83 : 15-20.
- Moons A., Bauw G., Prinsen E., Van Montagu M., Straeten D. V. D. 1995. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties. *Plant Physiology*, 107 : 177-186.
- Morillon R. and M.J. Chrispeels 2001. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 14138-14143
- Moya, J.L., Gomez-Cadenas, A., E. Primo-Millo and M. Talon. 2003. Chloride tolerance in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water usage, *J. Exp. Bot.* 383 : 825-833

Mittler, R., Vanderauwera, S. M. Gollery and F. Van Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9 : 490-487.

Naot D., Ben-Hayyim G., Eshdat Y. and Holland D. 1995. Drought, heat and salt stress induce the expression of a citrus homologue of an atypical late-embryogenesis Lea5 gene. *Plant Molecular Biology*, 27 : 619-622.

Ollitrault, P., Dambier, D., M. Seker and Y. Froelicher. 2000. Rootstock breeding by somatic hybridisation for the Mediterranean citrus industry. *Acta Horticulturae*. 535 : 157-162.

Porat R., Pavoncello D., Ben-Hayyim G., Lurie S. 2002. A heat treatment induced the expression of a Na^+/H^+ antiporter gene (*cNHX1*) in citrus fruit. *Plant Science* 162 : 957-963.

Pustovoitova, T.N., Eremin, G.V., Rassvetaeva, E.G., N.E. Zhdanova and V.N. Zholkevich. 1996. Drought resistance, recovery capacity, and phytohormone content in polyploid plum leaves. *Russian J. Plant Phys.* 43 : 232-235.

Rodrigo M. J., Alquezar B., Zacarías L. 2006. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Experimental Botany*, 57 : 633-643.

Romero-Aranda R., Bondada B. R., Syvertsen J. P., Grosser J. W. 1997. Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid Citrus. *Annals of Botany*, 79 : 153-160.

Romero-Aranda, R., Moya, J.L., Tadeo, F.R., Legaz, F., E. Primo-Millo and M. Talon. 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant, Cell and Env.* 21 : 1243-1253.

Sakamoto A. and Murata N. 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environment*, 25 : 163-171.

Saleh B., Allario T., Dambier D., P. Ollitrault and R. Morillon. 2008. Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *C. R. Biol.* 331 : 703-710.

Shi H., Lee B-H., Wu S-J., Zhu J-K. 2003. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21 : 81-85.

Song K., Lu P., Tang K., and Osborn T. C. 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploidy evolution. *Proceedings of National. Academy of Science*. 92 : 7719-7723.

- Subbarao G. V., Wheeler R. M., Levine L. H. and Stutte G. W. 2001. Glycine betaine accumulation, ionic and water relations of red-beet at contrasting levels of sodium supply. *Journal of Plant Physiology*. 158 : 767-776.
- Syvertsen J.P., L.S. Lee and J.W. Grosser (2000). Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 125 : 228-234.
- Syvertsen, J. and Y. Levy. 2005. Salinity interactions with other abiotic and biotic stresses in citrus. *Horttechnology* 15 : 100-103
- Ueda A., Kathiresan A., Inada M., Narita Y., Nakamura T., Shi W., Takabe T. and Bennett J. 2004. Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. *J.Exp. Bot.* 55 : 2213-2218.
- Wang, J., Tian, L., Lee, H-S, Wei, N., Jiang, H., Watson, B., Madlung, A., Osborn, T., Doerge, R. D., L. Comai and Z. J. Chen. 2006. Genome-wide Non-additive Gene Regulation in *Arabidopsis* Allotetraploids . *Genetics*. 172 : 507-517.
- Warner, D.A., M.S.B. Ku and G.E. Edwards. 1987. Photosynthesis, leaf anatomy, and cellular constituents in polyploidy C₄ grass *Panicum virgatum*. *Plant Physiol.* 84 : 461-466.
- Xiong Y-C, F-M. Li and T. Zhang. 2006. Performance of wheat crops with different chromosome ploidy : root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. *Planta*. 224: 710-718
- Zekri M. and L.R. Parsons. 1992. Salinity tolerance of *citrus* rootstocks: Effect of salt on root and leaf mineral concentrations, *Plant Soil*. 147: 171-181.

Figure captions

Figure 1: Maximum quantum yield of PSII $[(F_m - F_0)/F_m]$ measured along height weeks of salt stress on diploid and autotetraploid plants of trifoliate orange (A), Willow leaf mandarin (B) and on the allotetraploid FLHORAG1 (C). Leaf Chloride contents were as well measured along the same period for the same genotypes (D, E, F). Leaf chloride contents were expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-3}$ in order to take account of leaf thickness. (●: diploid / control condition ; ○: diploid / stress condition ; ▼: tetraploid / control condition ; ▽: tetraploid / stress condition). Values (Mean value $\pm$ SE) with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 2: Leaf sodium contents measured after 8 weeks of salt stress from diploid and autotetraploid plants of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and on the allotetraploid FLHORAG1. Leaf sodium contents were expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-3}$ in order to take account of leaf thickness. Vertical bars indicate the mean value $\pm$ SE, values with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 3: Root chloride (A) and sodium (B) contents measured after 8 weeks of salt stress from diploid and autotetraploid plants of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and on the allotetraploid FLHORAG1. Chloride and sodium contents were expressed in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ dry weight. Vertical bars indicate the mean value $\pm$ SE, values with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 4: Relative change of mRNA presence coded by genes of Protein Arginine n-Methyltransferase, PAM1 (A), ring-type Zinc Finger Protein, RZFP (B) and MYB8 Transcription factor, MYB8 (C). RNA were prepared from sampling harvested after seven weeks of stress when significant changes of maximum quantum yield of PSII and chloride contents values were observed. Vertical bars indicate the mean value $\pm$ SE, values with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 5: Relative change of mRNA presence coded by genes of Calcium sensor protein SOS3 (A), Plasma membrane Na^+/H^+ antiport, SOS1 (B), Vacuolar Na^+/H^+ antiport, cNHX1 (C), and

Chloride transporter, CCl2ac (D). RNA were prepared from sampling harvested after seven weeks of stress. Vertical bars indicate the mean value $\pm$ SE, values with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 6: Relative change of mRNA presence coded by genes of Choline MonOxygenase, CMO (A), Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylase-Synthetas, P5CS (B), 5-Late Embryogenesis Abundant Protein, cLEA5 (C), and 9-Cis –Epoxy-carotenoid-Dioxygenase, NCED (D). RNA were prepared from sampling harvested after seven weeks of stress. Vertical bars indicate the mean value $\pm$ SE, values with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

Figure 7: Relative change of mRNA presence coded by genes of Catalase 2, CAT2 (A) and Glutathion Reductase, GR (B). RNA were prepared from sampling harvested after seven weeks of stress. Vertical bars indicate the mean value $\pm$ SE, values with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

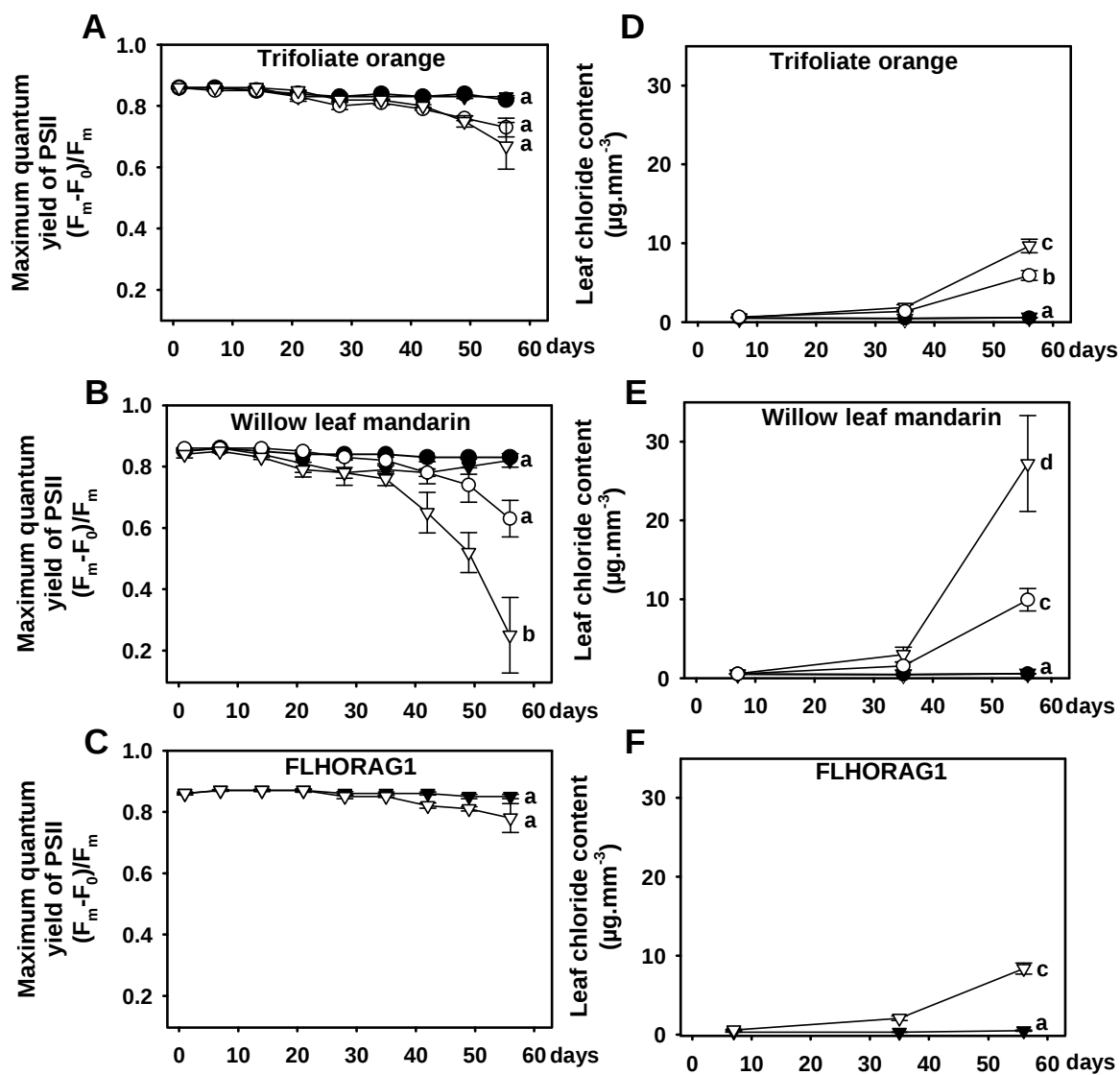


Fig. 1

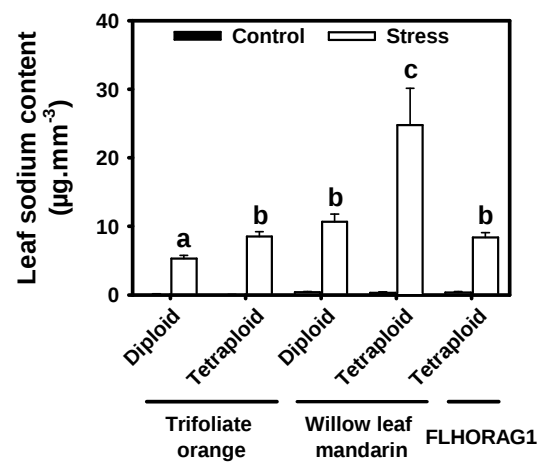


Fig. 2

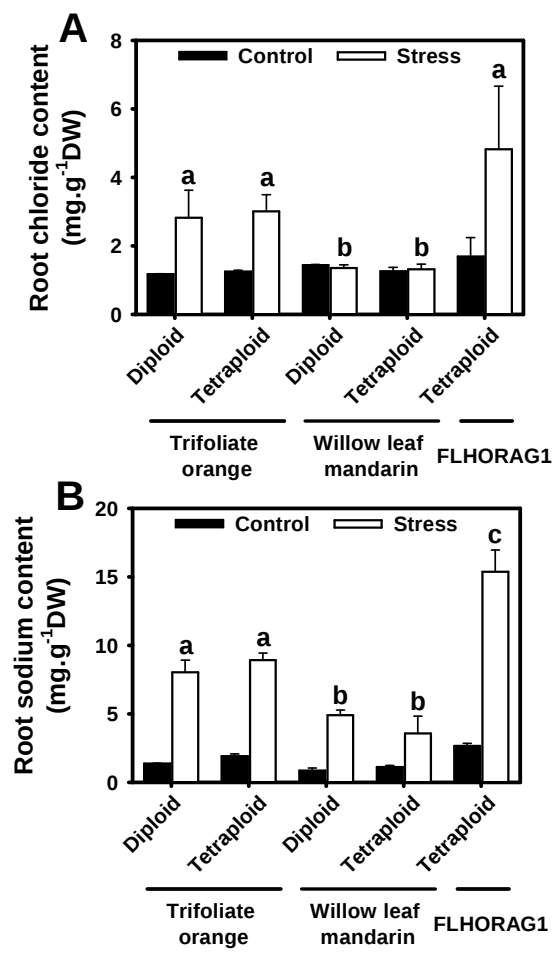


Fig. 3

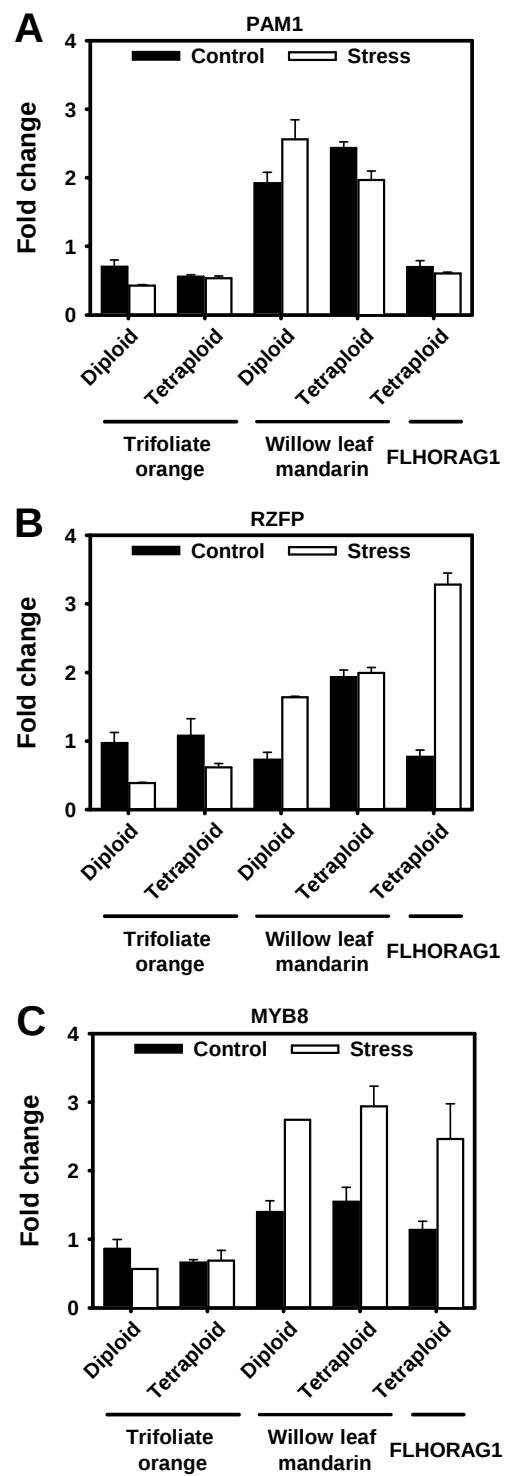


Fig. 4

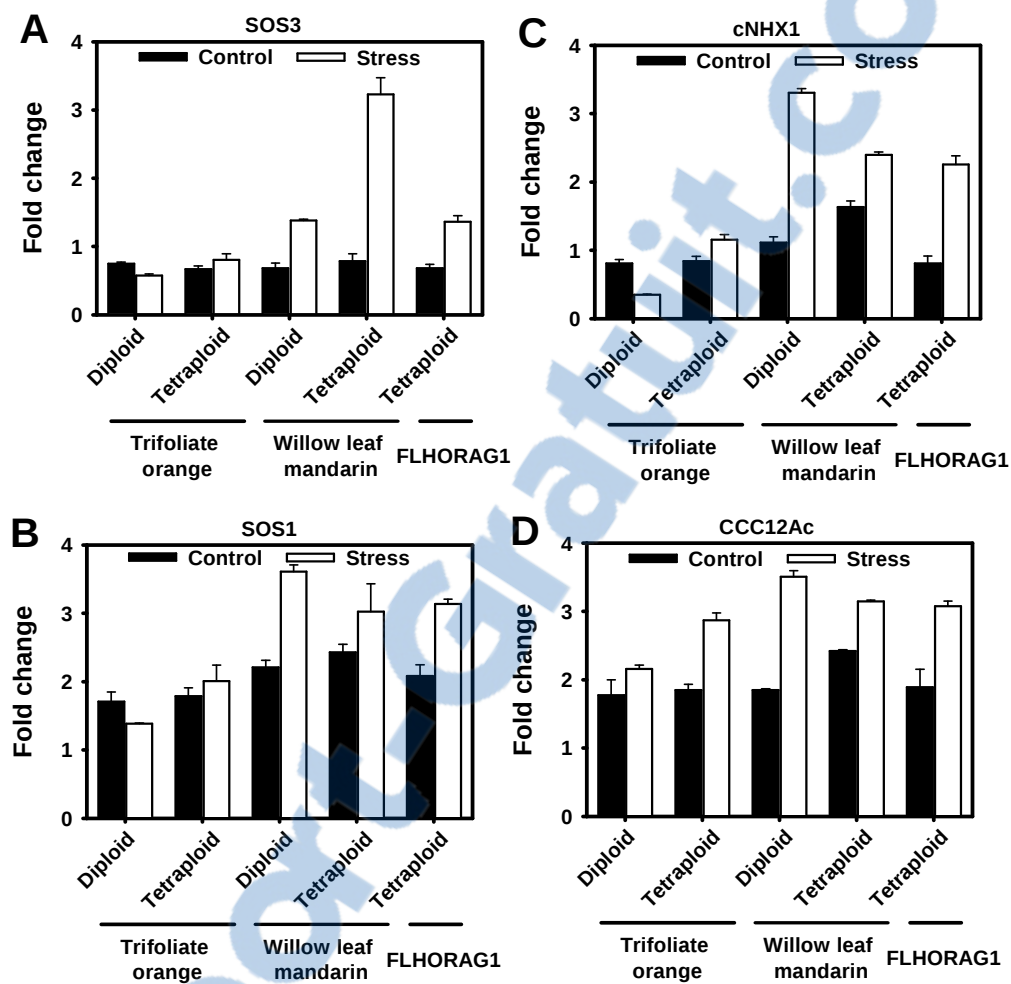


Fig. 5

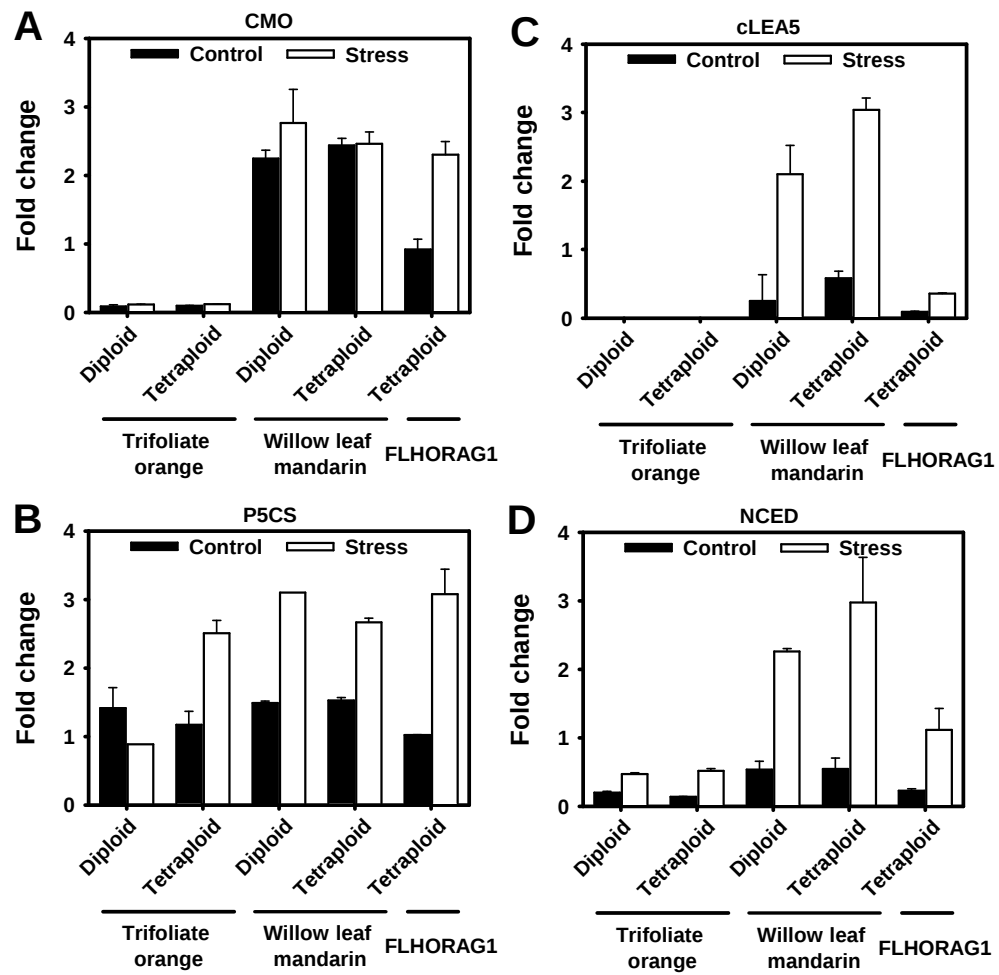


Fig. 6

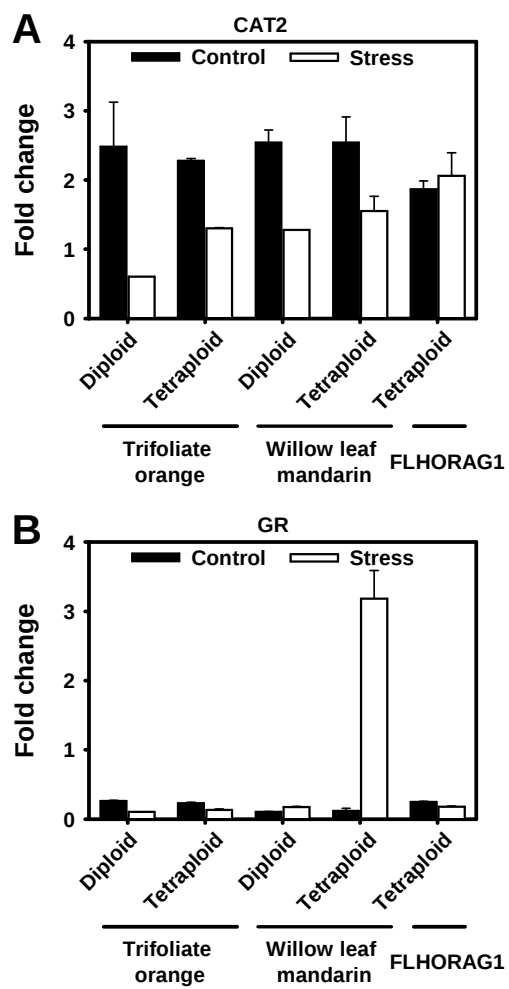


Fig. 7



Table captions

Table 1. Leaf water content and leaf thickness of diploid and autotetraploid of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and the allotetraploid, FLHORAG1, grown in control and after 49 days of salt stress. Values (Mean value $\pm$ SE) with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

	Trifoliate orange		Willow leaf mandarin		FLHORAG1
	diploid	tetraploid	diploid	tetraploid	tetraploid
Leaf water content	56,68 $\pm$ 1.24	60,62 $\pm$ 0.37	61,48 $\pm$ 0.36	68,30 $\pm$ 0.70	64,77 $\pm$ 0.42
Control condition	a	b	bc	de	d
(% of fresh weight)					
Leaf water content	56,95 $\pm$ 0.31	62,86 $\pm$ 0.83	65,76 $\pm$ 0.89	69,77 $\pm$ 1.45	67,33 $\pm$ 0.67
Stress condition	a	c	d	e	de
(% of fresh weight)					
Leaf thickness	0.284 $\pm$ 0.010	0.340 $\pm$ 0.009	0.247 $\pm$ 0.014	0.297 $\pm$ 0.012	0.298 $\pm$ 0.008
Control condition	ab	c	a	b	b
(mm)					
Leaf thickness	0.314 $\pm$ 0.007	0.352 $\pm$ 0.007	0.314 $\pm$ 0.007	0.301 $\pm$ 0.014	0.304 $\pm$ 0.006
Stress condition	bc	c	bc	bc	b
(mm)					

Table 2. Sodium /chloride content ratio in leaf and root for diploid and autotetraploid of trifoliate orange, Willow leaf mandarin and their allotetraploid, FLHORAG1. Leaf / root ratio of sodium and chloride for the same genotypes.

		Trifoliate orange		Willow leaf mandarin		FLHORAG1
		diploid	tetraploid	diploid	tetraploid	tetraploid
Sodium / Chloride ratio	Leaf	0,89	0,88	1,08	0,92	1,01
	Root	2,85	2,96	3,61	2,72	3,19
Leaf / Root ratio	Na ⁺	2,03	3,07	9,08	17,59	2,15
	Cl ⁻	6,47	10,35	30,49	52,17	6,81

Table 3. Sequences of the primers used to monitor by real time RT-PCR the expression of the candidate genes. Genes with a * were previously shown to be up or down regulated by salt stress in cDNA AFLP experiments (Mouhaya et al., submitted for publication). Other genes are candidate genes.

Name	Protein encoded by the targeted gene	Sequence of the Forward primer (5' -> 3')	Sequence of the Reverse primer (5' -> 3')	mRNA origin	Accession number	Size of the product of amplification (bp)	Tm
CMO*	Choline MonoOxygenase	gcaactggaaggttttctgc	caaggcgatgggtatcatct	<i>Citrus reticulata</i> x <i>C. temple</i>	aC32201B02EF_c	180	55
P5CS*	Delta 1 Pyrolline 5 Carboxylate Synthetase	atgtgcgtgctgctattgac	agtccaaatcgtgctccatc	<i>Citrus sinensis</i>	aCL174Contig2	166	55
cLEA5*	Group 5 Late Embryogenesis Abundant protein	acccttggggaccatatctc	ctctcgaagctctgctggat	<i>Citrus unshiu</i>	aCL9Contig8	166	57
NCED	9 Cis Epoxycarotenoid Dioxygenase	gaccagcaagtgggtgttcaa	agaggtggaaacaggagcaa	<i>Citrus cv. Shiranuhi</i>	aCL1933Contig1	163	55
cNHX1	Vacuolar Na ⁺ /H ⁺ antiporter	gcgggaaaacgctattatga	agtggctgcgacagagattt	<i>Citrus paradisi</i>	AY028416	171	54
SOS1	membrane Na ⁺ /H ⁺ antiporter	tctttccaggctcttgcttc	ggaccatgggggtttttatga	<i>Citrus clementina</i>	aIC0AAA94AC03R M1_c	173	52
CCC12 Ac	Chloride transporter	gtagggatgggtgaagatgc	aagctaccaccaataacgag	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_001036913	183	53

SOS3	Calcium protein sensor	tctttccaggctcttgcttc	ggaccatgggggttttatga	<i>Oryza sativa</i>	DQ201198	173	54
GR	Cytosolic glutathione reductase	ggaggagctacaaaacgtg	tgctggatttcagatgcttg	<i>Oryza sativa</i>	NM_001055020	179	55
CAT2	Catalase 2	accgtctagggccgaactat	tttcaggaggagttggatgc	<i>Citrus sinensis</i>	aCL63Contig2	174	53
PAM1*	Protein Arginine N-MethylTransferase	gatatgctctccgaccgtgt	ttcaacggcataaaccttc	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AJ007582	161	55
MYB8	MYB8 transcription factor	gaagtggatcggatcaaagg	gtgctcgacttgaggatgaca	<i>Citrus sinensis</i>	aCL891Contig1	174	56
RZFP	Ring H ₂ -Zinc Finger Protein	agccacttctccaagcacac	gttgaggagtccgaaacca	<i>Poncirus Rubidoux</i>	aCL198Contig1	170	56

II. Résultats complémentaires

Etude de la tolérance au stress salin chez deux variétés d'agrumes greffés sur les Poncirus diploïdes et autotétraploïdes et sur l'hybride FLHORAG1

Nous nous sommes intéressés à l'étude de la réponse au stress salin des porte-greffe Poncirus (diploïde et autotétraploïde) et FLHORAG1 greffés avec du cédratier et du clémentinier commun SRA92 (Tableau 3). Le cédratier étant une variété sensible et le clémentinier SRA92 une variété tolérante à la salinité, notre but était de vérifier si les propriétés de sensibilité/tolérance observés chez les porte-greffe francs de pied étaient transmises au niveau du greffon.

L'étude a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'article 2. Les mêmes modalités ont été appliquées pour les études physiologiques et moléculaires.

1. Etude des déterminants physiologiques de la tolérance à la salinité chez différentes associations porte-greffe / greffon

1.1. Epaisseur des feuilles et contenu en eau

En conditions témoins, nous avons observé que l'épaisseur des feuilles des deux variétés greffées augmentait avec le niveau de ploïdie des porte-greffe (Figure 15B). Par ailleurs, il faut noter que les feuilles du cédratier sont beaucoup plus épaisses que celles du clémentinier SRA92.

Au 49^{ème} jour du traitement salin, une diminution du contenu en eau est observée chez le clémentinier SRA92 greffé sur les Poncirus (Figure 15A). Aucune diminution significative du contenu en eau dans les feuilles des autres associations n'étant observée.

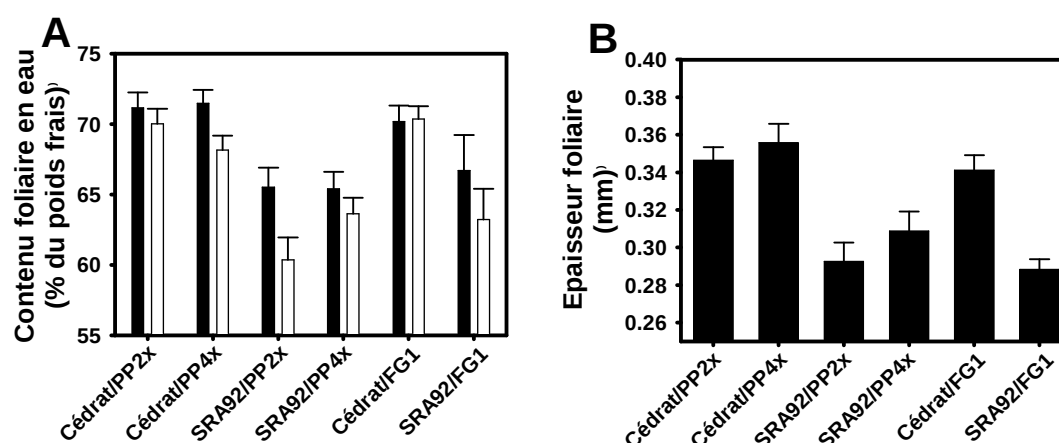


Figure 15. A. Contenu foliaire en eau mesurée au 49^{ème} jour du stress salin pour les variétés greffées cédratier et clémentinier SRA92. **B.** Epaisseur foliaire (en mm) des variétés greffées en fonction du porte-greffe utilisé en condition témoin.

A. (barres noires : condition témoin ; barres blanches : condition de stress) / Cédrat : cédratier ; PP : Poncirus Pomeroy ; FG1 : FLHORAG1

1.2. Fluorescence chlorophyllienne de feuilles, $[(F_m - F_0)/F_m]$

En réponse au stress salin, lorsque les Poncirus diploïdes et autotétraploïdes sont utilisés comme porte-greffe, la fluorescence chlorophyllienne $[(F_m - F_0)/F_m]$ mesurée sur les feuilles de cédratier ou de clémentinier SRA92 est légèrement affectée (Figure 16A & B). En revanche, lorsque le FLHORAG1 est utilisé comme porte-greffe, $[(F_m - F_0)/F_m]$ mesurée décroît de façon très importante, le cédratier semblant être plus affecté que le clémentinier SRA92 (Figure 16C & D).

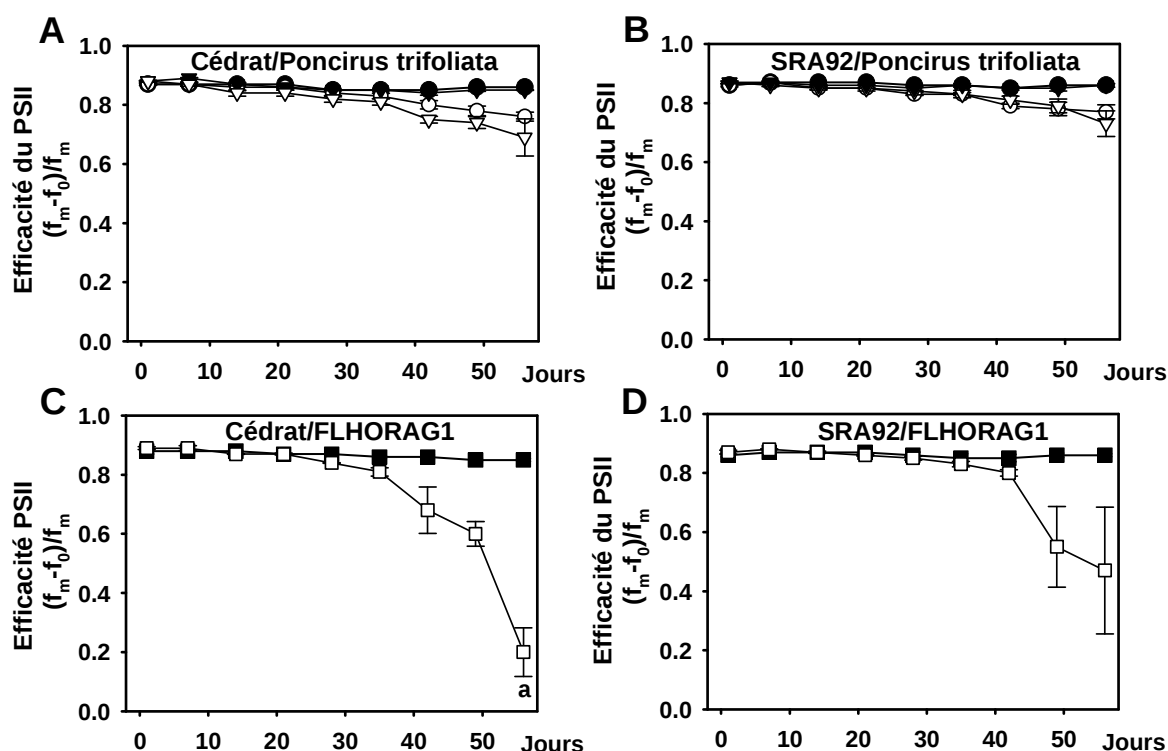


Figure 16. $[(F_m - F_0)/F_m]$ mesurée durant le stress salin chez les deux variétés greffées sur poncirus diploïdes et autotétraploïdes et FLHORAG1.

(A. Cédratier/*Poncirus trifoliata* ; B. Clémentinier SRA92/*Poncirus trifoliata* ; C. Cédratier/FLHORAG1 et D. Clémentinier SRA92/FLHORAG1. Symboles, rond : poncirus diploïde, triangle : poncirus autotétraploïde et carré : FLHORAG1 ; symbole plein : condition témoin ; symbole vide : condition de stress)

1.3. Contenus racinaires et foliaires en ions chlorures

Quelle que soit la variété greffée, les porte-greffe *Poncirus* diploïdes et autotétraploïdes accumulent les mêmes quantités d'ions chlorures dans les racines que lorsqu'ils sont francs de pied (Figure 17 et Figure 3/article 2). Le FLHORAG1 présente lui des concentrations en chlorures plus importantes lorsqu'il est greffé que pour les porte-greffe *Poncirus* diploïdes et autotétraploïdes greffés (avec un effet plus marqué lorsque le FLHORAG1 est greffé avec du clémentinier SRA92). Toutefois, les concentrations obtenues restent similaires à celles observées chez le FLHORAG1 franc de pied (Figure 3/article 2).

Au niveau foliaire, les *Poncirus* diploïdes et autotétraploïdes accumulent des concentrations similaires en chlorures, celles-ci étant également similaires à celles mesurées

dans les feuilles des Poncirus diploïdes (Figure 1D/article 2). En ce qui concerne, le FLHORAG1, lorsque celui-ci est greffé, les concentrations en chlorures mesurées sont beaucoup plus importantes et sont supérieures à celles obtenues pour le FLHORAG1 franc de pied (Figure 18C & D et Figure 1F/article 2). Il semble donc, qu'une limitation plus importante de l'absorption des ions chlorures au niveau racinaire comme c'est le cas pour les géotypes de Poncirus, puisse permettre de limiter le transfert des ions chlorures vers les parties aériennes. Dans le cas du FLHORAG1, il semble que l'absorption des ions chlorures au niveau racinaire ne soit pas limitée et se traduise par des concentrations plus fortes dans les feuilles des deux variétés.

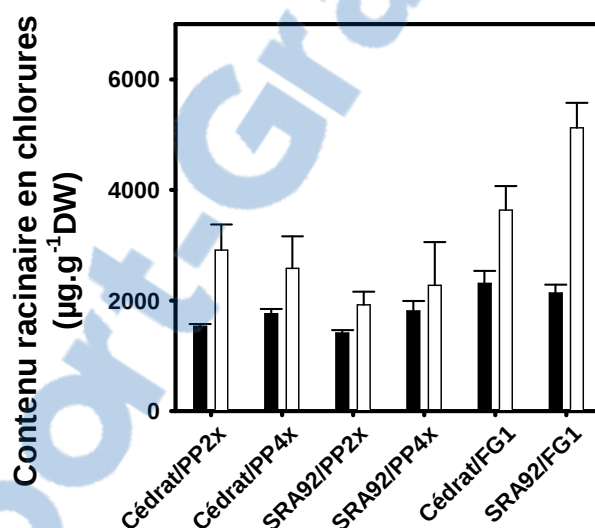


Figure 17. Contenu en ions chlorure dans les racines des porte-greffe, Poncirus diploïde et autotétraploïde et FLHORAG1, en association avec le cédratier et le clémentinier SRA92 au 49^{ème} jour de stress.

(Barres noires : condition témoin ; barres blanches : condition de stress) / Cédrat : cédratier ; PP : Poncirus Pomeroy ; FG1 : FLHORAG1

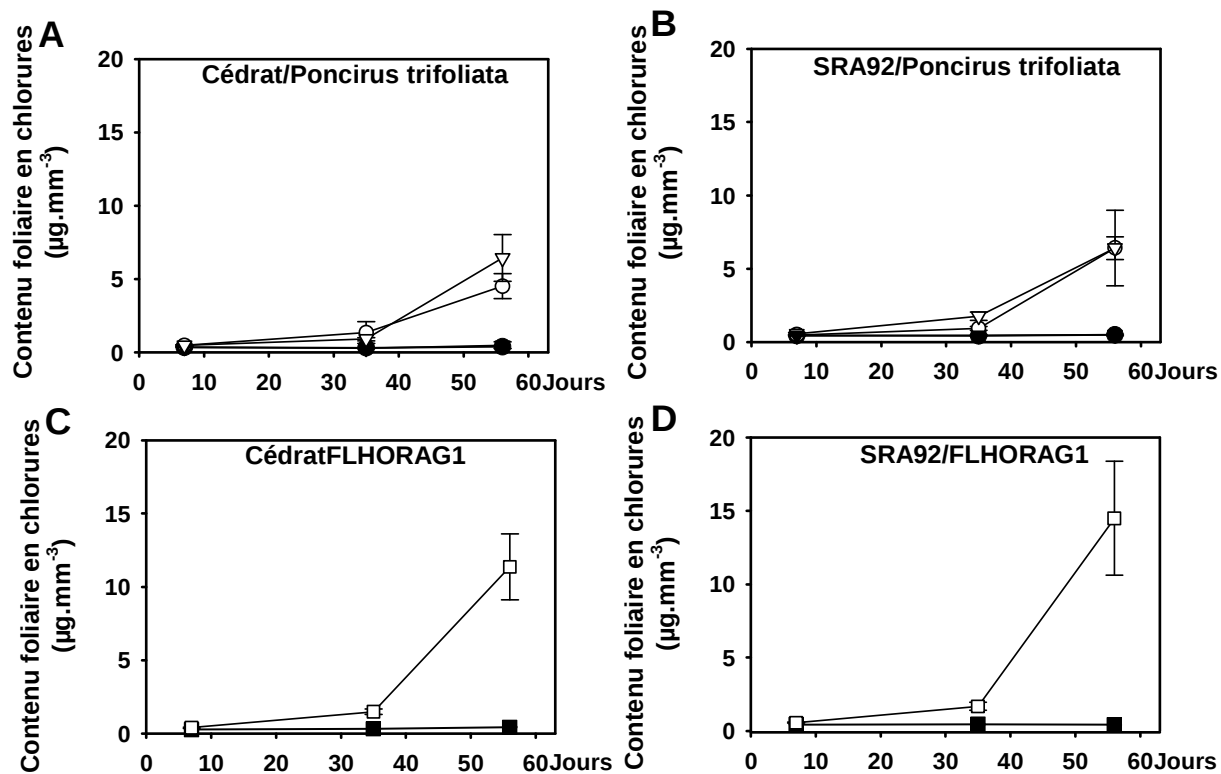


Figure 18. Evolution de l'accumulation foliaire des ions chlorures chez les deux variétés greffées sur les porte-greffe diploïdes et autotétraploïdes de *Poncirus* et sur le FLHORAG1 au cours du stress salin.

(A. Cédratier/*Poncirus trifoliata* ; B. Clémentinier SRA92/*Poncirus trifoliata* ; C. Cédratier/FLHORAG1 et D. Clémentinier SRA92/FLHORAG1. Symboles, rond : *poncirus* diploïde, triangle : *poncirus* autotétraploïde et carré : FLHORAG1 ; symbole plein : condition témoin ; symbole vide : condition de stress)

2. Etude des déterminants moléculaires de la tolérance au stress salin chez les différentes associations porte-greffe / greffon

2.1. Expression du gène *SOS3*, impliqué dans la transduction du signal lors d'un stress salin

En condition témoin, une forte expression constitutive du gène *SOS3* caractérise le cédratier lorsqu'il est greffé sur le Poncirus autotétraploïde comparé à lorsqu'il est greffé sur le Poncirus diploïde ou le FLHORAG1. Le clémentinier SRA92 greffé sur le Poncirus diploïde exprime plus de transcrits de *SOS3* que lorsqu'il est greffé sur le Poncirus autotétraploïde ou le FLHORAG1.

Comme chez le FLHORAG1 franc de pied, l'expression du gène *SOS3* est induite en situation de stress salin dans les feuilles de clémentinier SRA92 greffé sur ce même porte-greffe. En revanche, l'expression du *SOS3* est régulée négativement chez le cédratier greffé sur le FLHORAG1 (Figure 19).

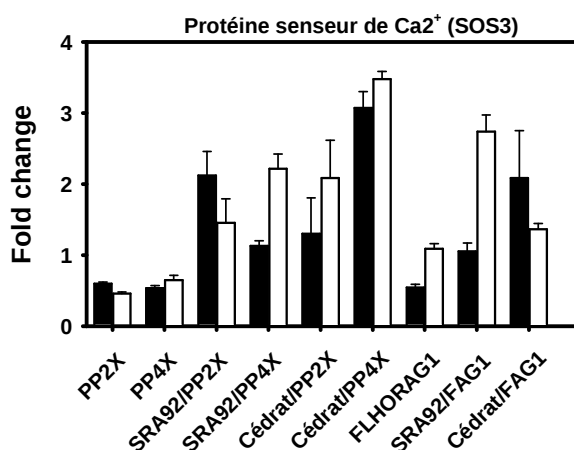


Figure 19. Niveau de transcrits foliaires du gène codant pour la protéine senseur de Ca^{2+} (*SOS3*) au 49^{ème} jour de stress chez les porte-greffe francs de pied et chez les variétés greffées sur poncirus diploïdes et autotétraploïdes et FLHORAG1.

(Barres noires : condition témoin ; barres blanches : condition de stress)



2.2.Expression du gène *NCED1*, impliqué dans la synthèse de l'ABA

En condition de stress salin, l'expression de *NCED1* est fortement induite chez le clémentinier SRA92 greffé sur les porte-greffe tétraploïdes. Par ailleurs, la quantité de transcrits ne semble pas être modifiée, en réponse au stress salin, dans les feuilles de clémentinier SRA92 greffé sur le Poncirus diploïde ou pour le cédrat greffé sur Poncirus diploïdes ou autotétraploïde ou sur le FLHORAG1 (Figure 20). On peut donc supposer que les porte-greffe tétraploïdes greffés avec de la clémentine SRA92 sont les seules associations qui régulent leur échanges respiratoires.

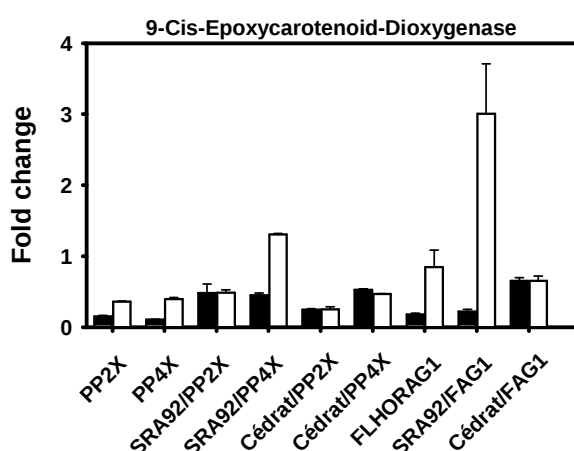


Figure 20. Niveau de transcrits foliaires du gène codant pour l'enzyme NCED1 au 49^{ème} jour de stress chez les porte-greffe francs de pied et chez les variétés greffées sur poncirus diploïdes et autotétraploïdes et FLHORAG1.

(Barres noires : condition témoin ; barres blanches : condition de stress)

2.3.Expressions de gènes impliqués dans l'ajustement osmotique

Quelque soit la condition, le gène *CMO* chez les porte-greffe Poncirus diploïdes et autotétraploïdes franc de pied est faiblement exprimé. En condition témoin, ce même gène est fortement exprimé dans les feuilles des variétés greffées sur ces mêmes porte-greffe. En condition de stress, le gène *CMO* est surexprimé chez le FLHORAG1 franc de pied et greffé avec du clémentinier SRA92. Par ailleurs, en situation de stress, si le niveau d'expression ne semble pas être modifié dans les feuilles du clémentinier greffé sur Poncirus, l'expression est

fortement réprimée dans les feuilles du cédratier greffé sur l'ensemble des porte-greffe (Figure 21A). En ce qui concerne l'enzyme osmoprotectrice P5CS, Purvis and Yelonsky (1983) n'ont observé aucune différence dans l'accumulation de cette enzyme entre la variété greffée et son porte-greffe. Dans notre étude, l'expression constitutive du *P5CS* est légèrement plus importante chez les variétés greffées sur les Poncirus diploïdes que chez les Poncirus diploïdes franc de pied. Il est intéressant de remarquer une forte expression induite par le stress du gène *P5CS* dans les feuilles des porte-greffe tétraploïdes francs de pied ou greffés avec le clémentinier SRA92 ou le cédratier (Figure 21B).

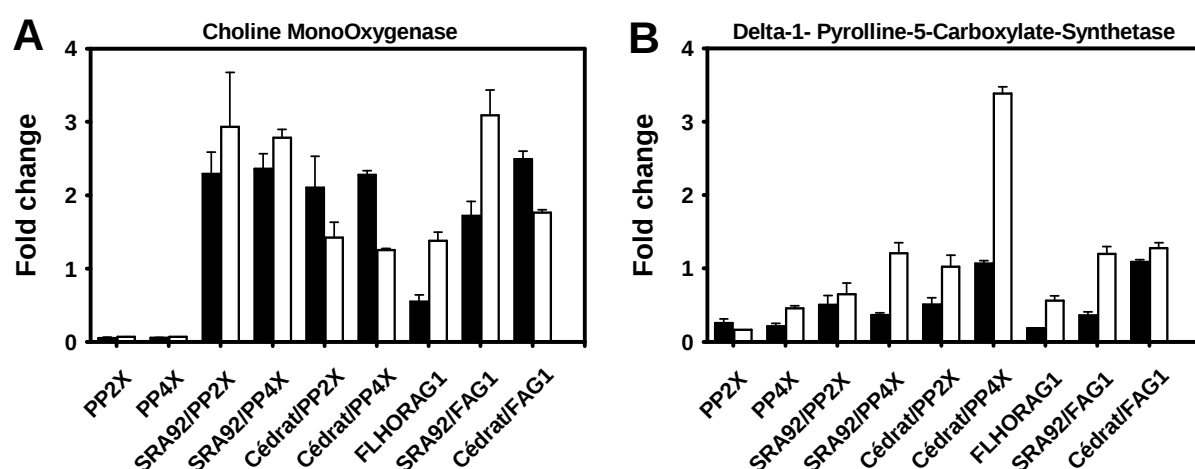


Figure 21. Niveaux de transcrits foliaires des gènes codant pour les enzymes CMO (A) et P5CS (B) au 49^{ème} jour de stress chez les porte-greffe francs de pied et chez les variétés greffées sur poncirus diploïdes et autotétraploïdes et FLHORAG1.

(Barres noires : condition témoin ; barres blanches : condition de stress)

Selon Temesvariné, (2004), l'ABA est la molécule signal indispensable pour l'activation de la synthèse de la proline en condition de stress salin. Dans notre étude, une corrélation peut être observée en ce qui concerne l'augmentation de l'expression des gènes *NCED1* et *P5CS* dans les feuilles du clémentinier SRA92 greffé sur l'ensemble des porte-greffe utilisés. Il est intéressant d'observer que le niveau d'expression de *NCED1* en condition témoin et en condition de stress dans les feuilles du cédratier greffé sur les porte-greffe Poncirus diploïdes et autotétraploïdes n'est pas significativement modifié. Toutefois, on peut remarquer que pour les associations cédratier / poncirus diploïde et autotétraploïde, une très forte expression de

P5CS en situation de stress salin peut être observée suggérant que l'activation de la synthèse de proline puisse être médiée par une voie biochimique différente de celle de *NCED1*. (Figures 20 & 21B).

2.4.Expression du gène codant pour la protéine chaperonne cLEA5

Lorsqu'ils sont greffés sur les porte-greffe tétraploïdes (Poncirus et FLHORAG1), le cédratier et le clémentinier SRA92 expriment fortement le gène *cLEA5* en réponse au stress salin (Figure 21). Selon Dure, (1993) et Hundertmark and Hinch, (2008), l'ABA induirait l'expression des gènes codant pour les protéines LEA. Dans notre étude, une corrélation entre l'expression de *NCED1* et celle de *cLEA5* n'a pu être observée que dans le cas des porte-greffe tétraploïdes francs de pied et chez le clémentinier SRA92 lorsqu'il est greffé sur ces mêmes porte-greffe (Figure 20 & 21B). Là encore, en fonction de la variété utilisée, il semble que l'activation de la synthèse de la protéine chaperone cLEA5 puisse être médiée suite à l'induction de *NCED1*.

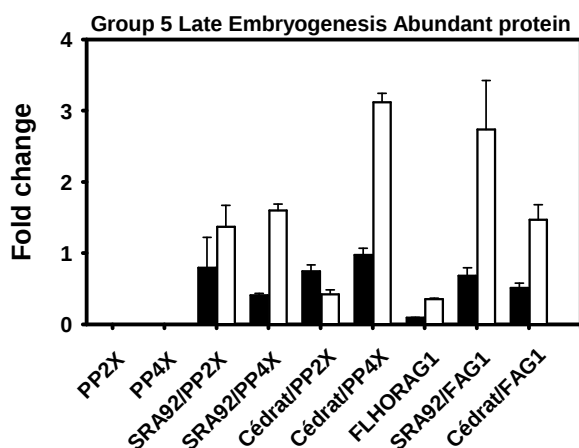


Figure 22. Niveau de transcrits foliaires du gène codant pour la protéine chaperonne cLEA5 au 49^{ème} jour de stress chez les porte-greffe francs de pied et chez les variétés greffées sur les Poncirus diploïdes et autotétraploïdes et FLHORAG1.

(Barres noires : condition témoin ; barres blanches : condition de stress)

2.5.Expression du gène codant pour un transporteur d'ions chlorures

D'après les résultats du dosage des ions chlorures dans les feuilles, les variétés cédratier et SRA92 accumulaient des concentrations d'ions chlorures plus importante dans le cas où le FLHORAG1 était utilisé comme porte-greffe (Figures 18C & D). Cet effet semblait plus prononcé chez le clémentinier SRA92 (Figure 18D). L'étude de l'expression du gène *CCC12Ac*, codant pour un transporteur de chlorures récemment identifié par Colmenero-Flores *et al.*, (2007), a permis de mettre en évidence une surexpression de ce gène dans les feuilles du clémentinier SRA92 greffé sur FLHORAG1 en condition de stress salin (Figure 22). Dans le cas de du cédratier greffé sur FLHORAG1, l'accumulation foliaire en chlorures était également importante mais aucune surexpression de *CCC12Ac* n'a pu être mise en évidence en situation de stress salin. Le cédratier et le clémentinier sont génétiquement relativement éloignés. Il est donc fort probable que d'autres gènes codants pour des transporteurs de chlorures autres que *CCC12Ac* soient impliqués dans le transport des chlorures au niveau des feuilles du cédratier. (Figure 18C et l'article 2).

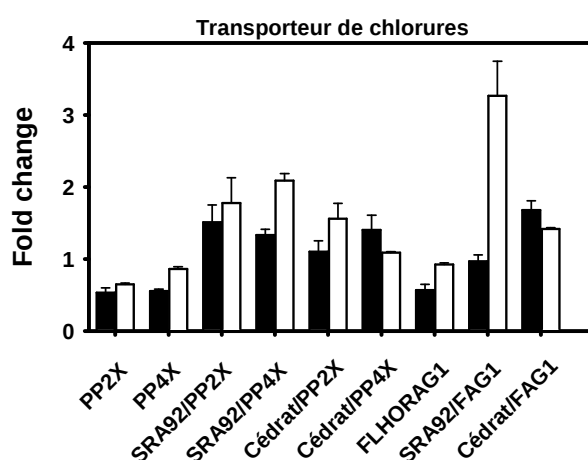


Figure 23. Niveau de transcrits foliaire du gène codant pour le transporteur de Cl^- (*CCC12Ac*) au 49^{ème} jour de stress chez les porte-greffe francs de pied et chez les variétés greffées sur poncirus diploïdes et autotétraploïdes et FLHORAG1.

(Barres noires : condition témoin ; barres blanches : condition de stress)

DISCUSSION GENERALE

Dans cette discussion nous aborderons tout d'abord l'effet de la polyploïdisation sur les porte-greffe d'agrumes, son impact sur la réponse au stress salin chez les porte-greffe francs de pied et ensuite la réponse des variétés greffées sur ces derniers au stress salin.

I. Effet de l'auto- et l'allopolyplôidisation chez les porte-greffe d'agrumes en condition de non stress

Comme chez la plupart des plantes, la polyploïdisation entraîne divers changements morphologiques et anatomiques qui vont avoir un impact sur la croissance et le développement des porte-greffe d'agrumes. Ces changements sont liés à la modification de l'expression du génome. Parmi les traits phénotypiques modulés par la polyploïdisation, nous avons noté la couleur et l'épaisseur foliaires, et la taille des cellules stomatiques, comme précédemment observé par Romero-Aranda *et al.*, (1997) et Carvalho Costa *et al.*, (2004). En effet chez l'ensemble des tétraploïdes (auto- et allo-) étudiés, les feuilles étaient plus épaisses et plus vertes comparé aux diploïdes. Les mesures au SPAD de la quantité de chlorophylle ont montré que les tétraploïdes avaient des feuilles plus concentrées en chlorophylle. Nous avons de même observé une augmentation de la taille des cellules stomatiques chez les tétraploïdes. Pour l'ensemble des caractères précédemment cités, l'allotétraploïde FLHORAG1, qui lui-même est trifolié, présentait un phénotype plus proche du *Poncirus* autotétraploïde que du mandarinier autotétraploïde.

Au niveau végétatif, les autotétraploïdes présentaient une croissance plus lente comparé aux diploïdes. La réduction de la taille des arbres d'agrumes a déjà été commentée par Barrett (1992). L'allotétraploïde FLHORAG1 présentait lui, un taux de croissance intermédiaire entre ses parents diploïdes (*Poncirus* et mandarinier commun) et un taux supérieur à celui des génotypes autotétraploïdes.

En ce qui concerne l'expression des génomes des différents génotypes, nous avons pu observer quelques différences dans l'expression de certains des gènes candidats entre les diploïdes et les autotétraploïdes du mandarinier commun. Il est connu que la polyploïdisation induit différents changements génomiques et transcriptomiques chez les plantes. L'activation/inactivation de gènes, l'expression inégale des gènes dupliqués ou encore les changements de méthylation de l'ADN sont d'autant de conséquences induites par la

polyploïdisation. Dans notre cas, certaines modifications de l'expression de gènes ont été observées chez les autotétraploïdes du mandarinier. La surexpression du gène codant pour la protéine régulant la transcription par méthylation (PAM1) montre que la méthylation serait impliquée dans la modification de l'expression du génome dupliqué chez ce génotype. De même, nous avons remarqué la surexpression du facteur de transcription zinc finger protein et des transporteurs ioniques (cNHX1 et CCC12Ac). La plus importante différence d'expression a pu être observée au niveau du gène codant pour le facteur de transcription zinc finger protein qui est exprimé deux fois plus chez le mandarinier autotétraploïde par rapport au diploïde. Martelotto *et al.*, (2005) ont observé une surexpression des protéines zinc finger chez les autotétraploïdes de *Paspalum notatum*. Par ailleurs, aucune différence d'expression significative n'a pu être observée entre les Poncirus diploïdes et autotétraploïdes. Pour sa part, l'allotétraploïde FLHORAG1 avait soit un niveau d'expression intermédiaire entre les deux parents (*NCED1*, *SOS1*, *CMO* et *cLEA5*) ou similaire au parent Poncirus (*cNHX1* et *CCC12Ac*) ou encore un niveau plus faible que chez ses parents (*P5CS*) (article 2). Toutefois, il est intéressant de rappeler que l'analyse des 23 profils d'expression des TDF obtenus par cDNA-AFLP, a montré que le FLHORAG1 semblait plus proche de son parent mandarinier commun (article 1).

II.Effet de l'auto- et l'allopolyplôidisation chez les porte-greffe d'agrumes en condition de stress salin

1.Le porte-greffe Poncirus trifoliata

Dans les conditions de traitement salin de l'expérience décrite dans le premier article, les génotypes diploïdes et autotétraploïdes du Poncirus et du mandarinier commun et le FLHORAG1, ont probablement subi entre deux arrosages, une limitation en apport eau. Le potentiel hydrique du sol n'était probablement pas constant au cours de cette expérimentation, celui-ci diminuant entre chaque arrosage. Dans ces conditions, et comme il a été déjà décrit par Tozlu *et al.*, (2000), le Poncirus diploïde présentait une plus forte sensibilité au sel. Au bout de 7 semaines de stress, le Poncirus diploïde accumulait des ions chlorures (6mg /g de poids sec) mais pas d'ions sodium et présentait des symptômes de chlorose foliaire, une chute des feuilles étant également observée. En revanche, pour les autotétraploïdes de Poncirus et le FLHORAG1, malgré une accumulation similaire en chlorures à celle du Poncirus diploïde,

leurs feuilles ne présentaient aucun symptôme de chlorose. Nos résultats semblent donc confirmer que la sensibilité des agrumes au sel est bien liée aux ions chlorures. Toutefois, on peut supposer que d'autres facteurs peuvent être impliqués pour induire les chloroses et la chute de feuilles observée. Dans des conditions très similaires, Saleh *et al.*, (2008) ont observés des phénotypes analogues. On peut supposer que si le potentiel hydrique ait pu diminuer entre chaque arrosage (c'est-à-dire qu'en plus du stress ionique occasionné par le stress salin, un déficit hydrique ait également pu être imposé), les échanges respiratoires aient pu être modifiés. En cas de déficit hydrique, la conductance stomatique diminue progressivement et par là même les échanges respiratoires. La réduction de la photosynthèse associée à la présence d'ions chlorures toxiques pourraient être à l'origine d'une synthèse accrue d'espèces actives de l'oxygène ROS, pouvant expliquer les phénotypes de chlorose observés. Les porte-greffe autotétraploïdes de Poncirus et FLHORAG1 accumulent tout autant d'ions chlorures que les Poncirus diploïdes, pourtant ils ne présentent pas de phénotypes de stress ionique. Si notre hypothèse est vraie, il est probable que les porte-greffe tétraploïdes soient plus tolérants au déficit hydrique. Une régulation plus efficace des échanges respiratoires pourrait être à l'origine de cette tolérance et par la même à l'origine de la moindre croissance observée des plants tétraploïdes par rapport aux plants diploïdes.

Dans les conditions de traitement salin de l'expérience décrite dans le deuxième article, les génotypes ont été soumis à un arrosage quotidien (0.5L) avec des concentrations croissantes en sel (50-400mM). La haute fréquence des arrosages a permis de maintenir constant le potentiel hydrique du sol, celui-ci étant imposé essentiellement par les concentrations en ions sodium et chlorures. Les contenus en eau des feuilles n'ont pas été diminués par le stress salin, mais plutôt augmentées suggérant qu'il n'y a pas eu de limitation en apport d'eau. Des chloroses foliaires ont toutefois été observées à la fin du stress pour les génotypes autotétraploïdes de Poncirus mais aucune chute de feuilles n'a été observée chez les génotypes Poncirus.

Au cours du stress, chez les diploïdes et les autotétraploïdes de Poncirus, la fluorescence chlorophyllienne de feuilles, $[(F_m - F_0)/F_m]$, n'a été que légèrement affectée par le stress. L'accumulation en ions sodium et chlorures dans les feuilles du Poncirus autotétraploïde a été plus importante que chez les diploïdes, tandis qu'au niveau des racines aucune différence n'a été observée.

En ce qui concerne l'expression des génomes en situation de stress, des différences ont pu être observées entre diploïdes et tétraploïdes. Ainsi, il semble que le Poncirus autotétraploïde présente des niveaux d'expression supérieurs au Poncirus diploïde. C'est le cas des gènes codant pour les antiports Na^+/H^+ (*cNHX1* et *SOS1*), le facteur de transcription zinc finger protein, la *P5CS*, et pour les enzymes de détoxification *CAT2* et *GR*. Seuls les gènes codant pour *NCED1* et pour le transporteur d'ions chlorures (*CCC12Ac*) sont surexprimés chez l'ensemble des génotypes. Chez le Poncirus autotétraploïde, on peut noter une surexpression des gènes *NCED1*, *P5CS*, *cNHX1*, *SOS1* et *CCC12Ac*. En ce qui concerne les gènes *CMO* et *cLEA5*, les Poncirus les expriment à des niveaux très bas comparé aux autres génotypes, suggérant qu'aucun phénomène d'ajustement osmotique n'ait été encore déclenché.

2. La variété mandarinier commun

En condition de stress salin modéré (article 1), les mandariniers communs diploïdes et tétraploïdes accumulaient de faibles quantités d'ions chlorures et de fortes quantités d'ions sodium comparé aux Poncirus. Aucun symptôme de chlorose foliaire n'a alors été observé. En condition de forte salinité (article 2), les mandariniers étaient les premiers à avoir présenté des symptômes de chlorose foliaire et de chute de feuilles. Dans ces mêmes conditions, ils ont été les génotypes qui accumulaient le plus d'ions chlorures, le mandarinier autotétraploïde étant le génotype présentant les concentrations les plus fortes ($62.9 \pm 5.3 \text{ mg.g}^{-1}$ de poids sec). De même, cette forte accumulation dans les feuilles en ions chlorures était tout à fait en corrélation avec la forte baisse de $(F_m - F_0)/F_m$. En revanche, ces génotypes étaient les seuls à ne pas accumuler les ions chlorures au niveau racinaire. On peut donc supposer que pour ces génotypes, les ions chlorures ayant été absorbés au niveau racinaire aient directement été transportés dans les feuilles.

En ce qui concerne les ions sodium, les mandariniers accumulaient également des quantités importantes au niveau des feuilles, les autotétraploïdes présentant les plus fortes concentrations. Au niveau racinaire aucune différence d'accumulation n'a été notée entre les diploïdes et les tétraploïdes.

Les mandariniers, les génotypes les plus affectés par le stress, ont montré une très forte induction de certains gènes dont *SOS3*, *SOS1*, *cNHX1*, *CCC12Ac*, *NCED1*, *P5CS*, *cLEA5* et *GR* suggérant qu'au cours du stress les stomates se soient fermés et qu'un stress oxydatif

important ait pu être déclenché. En condition de stress oxydatif, il a été rapporté chez les agrumes l'induction de l'expression du gène *cLEA5* (Naot *et al.*, 1995). Chez le mandarinier diploïde, l'expression du *cNHX1*, *SOS1* et *CCC12Ac* et des facteurs de transcription et du *P5CS* était plus importante que chez le tétraploïde. Dans les conditions de stress de l'expérimentation, il est probable que le déficit hydrique appliqué a été dépendant principalement de la concentration en sel dans le sol. Dans ces conditions, les stomates des différents génotypes sont restés ouverts permettant de maintenir un niveau élevé de transpiration. Les ions chlorures et sodium étant transportés dans les feuilles dans le flux de transpiration, de très fortes concentrations en ions chlorures et sodium ont pu être enregistrées. A la fin du stress, le stress salin imposé était considérable (400 mM), on peut donc supposer qu'une régulation de la fermeture stomatique ait pu être induite pour les génotypes les plus accumulateurs. La très forte induction du gène *NCED1* chez les mandariniers autotétraploïdes corrobore cette hypothèse. Si une réduction de conductance stomatique a été induite, celle-ci a fortement diminué la photosynthèse et il est probable qu'une synthèse accrue d'ROS ait été déclenché ce qui pourrait expliquer le fait que le gène *GR* soit fortement surexprimé chez ce génotype.

3. Le FLHORAG1

Physiologiquement, l'hybride allotétraploïde se comporte comme son parent *Poncirus* autotétraploïde et ce dans les deux expériences de stress salin. Comparé aux diploïdes et tétraploïdes de *Poncirus*, le FLHORAG1 accumule les mêmes quantités d'ions chlorures dans les feuilles et dans les racines et subit la même légère diminution de $(F_m - F_0)/F_m$. Toutefois, au cours des deux expérimentations, ce génotype n'a jamais montré de chute de feuilles. En ce qui concerne les contenus en sodium, le FLHORAG1 accumule autant que les *Poncirus* au niveau des feuilles, mais au niveau racinaire, il accumule de plus fortes quantités que ses deux parents. On peut donc supposer que cette compartimentation racinaire pourrait être un moyen d'éviter le transfert des ions toxiques vers les feuilles.

En ce qui concerne l'expression des gènes candidats, le FLHORAG1 semble être plus proche du parent mandarinier, il surexprime l'ensemble des transporteurs ioniques, le *SOS3*, *P5CS*, *CMO*, *cLEA5*, *NCED1*, zinc finger protein, et *MYB8*. Chez l'allotétraploïde,

l'expression du gène *CAT2* n'est pas modifiée, alors qu'une sous-expression peut être observée pour l'ensemble des autres génotypes observés.

III. Réponse des variétés greffées sur les porte-greffe autotétraploïdes de *Poncirus* et sur l'allotétraploïde FLHORAG1

Au 49^{ème} jour de stress (400mM NaCl), le cédratier et le clémentinier SRA92 greffés sur l'allotétraploïde FLHORAG1, ont accumulé le plus d'ions chlorures (Figures 16C & D). En accumulant de hautes concentrations de chlorures, ces variétés ont présenté la plus forte baisse de $(F_m - F_0)/F_m$, ce comportement nous rappelle celui du mandarinier commun autotétraploïde franc de pied. Le FLHORAG1 greffé accumule les mêmes quantités d'ions chlorures au niveau de ses racines que lorsqu'il est franc de pied. En revanche, l'accumulation des chlorures au niveau des feuilles de variétés greffées sur le FLHORAG1 est beaucoup plus importante que celle observée sur ses propres feuilles. En association le FLHORAG1 ne limiterait pas l'accumulation des chlorures au niveau du greffon.

Chez le SRA92 greffé sur le FLHORAG1, la surexpression du gène *NCED1* corrèle avec la forte accumulation de chlorures, la baisse du contenu hydrique des feuilles et avec la baisse du $(F_m - F_0)/F_m$. Nous pouvons donc supposer qu'en plus du stress ionique, l'association FLHORAG1 / SRA92 a subi un déficit hydrique entraînant la régulation de l'ouverture stomatique et la réduction de la photosynthèse. L'étude de l'expression des gènes *SOS3*, *P5CS*, *CMO* et *cLEA5* a mis en évidence la perception du signal de stress et le déclenchement de l'ajustement osmotique chez le clémentinier SRA92.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence différents déterminants physiologiques et moléculaires impliqués dans la tolérance au stress salin chez les porte-greffe tétraploïdes d'agrumes. De manière à mieux comprendre leur comportement vis-à-vis du stress salin, il paraissait important de décrire tout d'abord leurs caractéristiques anatomiques et végétatives. En effet, la polyploïdisation a entraîné l'augmentation de l'épaisseur, de la taille des stomates et du contenu en chlorophylle des feuilles chez le mandarinier commun et le *Poncirus* autotétraploïdes et chez le FLHORAG1. Ces changements anatomiques ont eu un impact sur le développement et la croissance des porte-greffe d'agrumes, les autotétraploïdes étant de moindre vigueur que les diploïdes. Ces changements étaient probablement liés à des modifications de l'expression du génome. En effet, nous avons pu démontrer l'implication de la méthylation de l'ADN dans le changement de l'expression du génome, le mandarinier autotétraploïde surexprimant PAM1 comparé au diploïde. Il serait intéressant d'approfondir l'étude de l'impact de la polyploïdisation sur le génome des porte-greffe d'agrumes par des analyses de méthylation d'ADN et par l'étude d'expression de gènes codant pour d'autres facteurs de transcription tels que les protéines WRKY, CFB/DREB...

En confrontant les réponses des porte-greffe polyploïdes à deux types de stress salin : un premier stress salin modéré (50mM NaCl ; deux arrosages par semaine) imposant un déficit hydrique et un second à forte salinité (50-400mM NaCl ; arrosage quotidien) sans limitation d'eau, nous avons relevé l'importance de la composante déficit hydrique dans le déclenchement de la tolérance au stress salin chez les porte-greffe tétraploïdes. L'application du second stress salin chez les porte-greffe les soumet à un stress ionique sans limitation en eau. Dans ces conditions, on peut supposer que les stomates ne se soient pas fermés et que le flux de transpiration ait été maintenu impliquant la montée de grandes quantités de sel vers les parties aériennes. En effet l'ensemble des génotypes polyploïdes étudiés ont montré des phénotypes tolérants lorsqu'ils avaient subi un déficit hydrique. Ainsi, les tétraploïdes seraient capables de réguler leurs échanges gazeux de manière plus efficace que les diploïdes, limitant la montée des sels à travers le flux de transpiration. En situation de stress ionique strict, les génotypes tétraploïdes n'ayant subi aucun déficit hydrique, ont montré une forte accumulation des ions chlorures, plus spécialement chez le mandarinier autotétraploïde, qui a subi par conséquence une forte baisse du rendement chlorophyllien. En subissant un stress salin et probablement un déficit hydrique, ce génotype n'a accumulé que de faibles concentrations de

chlorures au niveau des feuilles. En réponse à 400mM de NaCl, le mandarinier autotétraploïde a surexprimé fortement le gène *NCED1*, impliqué dans la voie de biosynthèse de l'ABA. L'ABA produit a déclenché la fermeture des stomates induisant ainsi la réduction de la photosynthèse. Les modifications des échanges gazeux ont probablement entraîné le déclenchement de la production des ROS, ce qui expliquerait la forte induction du gène codant pour la glutathion réductase GR. Par ailleurs, le mandarinier autotétraploïde a présenté une surexpression de *SOS3*, de l'ensemble des transporteurs ioniques, de *P5CS*, de *cLEA5*, et de *Myb8*. Les surexpressions de *cLEA5* et de *MYB8* suggèrent que ce génotype a été soumis à un stress oxydatif en plus du stress ionique.

Qu'il ait été en déficit hydrique ou en stress ionique strict, le *Poncirus* autotétraploïde accumulait les mêmes concentrations d'ions chlorures. En revanche il ne présentait de symptôme de chlorose que lorsqu'il était en stress ionique strict. A 400mM de NaCl, le *Poncirus* tétraploïde a exprimé très faiblement les gènes codant pour l'enzyme CMO et la protéine chaperonne *cLEA5* et a sousexprimé les enzymes de détoxification. Face au stress oxydatif, le *Poncirus* n'était protégé ni par des osmoprotecteurs ni par des enzymes antioxydantes, ce qui explique l'apparition des chloroses à la fin du stress. En ce qui concerne le *FLHORAG1*, quelle que soit la condition de stress salin appliquée, il a présenté des accumulations de chlorures similaires au *Poncirus* autotétraploïde, en revanche, il ne présentait aucun symptôme de chlorose. En surexprimant la totalité des effecteurs de la tolérance au sel que ce soit ceux impliqués dans la perception et la transduction du signal (*NCED1*, *SOS3*), dans le transport ionique (*cNHX1*, *CCC12Ac*, *SOS1*), l'ajustement osmotique (CMO, *P5CS*, *cLEA5*) et dans la régulation de la transcription du génome (zinc finger protein, *Myb8*), le *FLHORAG1* se montre d'une tolérance accrue au stress salin. L'ensemble de ces résultats confirment que la sensibilité des agrumes au stress salin est due particulièrement aux ions chlorures tout en supposant que leur accumulation n'est pas le seule responsable de l'apparition des symptômes de chlorose. La montée des chlorures et leur accumulation sont accompagnées par une limitation de la photosynthèse qui induirait la production d'ROS responsables de forts dommages au niveau des membranes et des macromolécules. L'efficacité des mécanismes de détoxification antioxydante et de synthèse d'osmoticums jouent alors un rôle majeur dans la mise en place de la tolérance au sel. Il serait alors intéressant de quantifier les concentrations d'ABA, de proline, de glycine-bétaïne et par la même, doser les ROS produites suite au stress salin et l'activité des enzymes antioxydantes

afin de confirmer nos résultats et mettre en corrélation la transcription et l'accumulation des effecteurs de la tolérance au stress salin chez les différents génotypes.

En situation de stress salin stricte, les variétés greffées sur le FLHORAG1 ont accumulé de hautes concentrations de chlorures et ont subi une forte baisse de photosynthèse comparé à lorsqu'ils étaient greffés sur Poncirus. Le comportement des variétés greffées sur le FLHORAG1 nous rappelle celui du mandarinier commun autotétraploïde en situation de stress salin. Ces conséquences physiologiques ont été accompagnées chez le clémentinier SRA92 greffé sur le FLHORAG1 par l'induction de l'expression des gènes NCED1, SOS3, SOS1, cNHX1, CCC12Ac, CMO, P5CS, cLEA5, une réponse rappelant celles du FLHORAG1 franc de pied et du mandarinier autotétraploïde. En situation de stress salin stricte, l'association du clémentinier SRA92 avec le FLHORAG1 est sensible aux chlorures accumulés suite à l'apport continu d'eau. Toutefois le clémentinier SRA92 répond au stress en surexprimant la totalité des effecteurs de la tolérance au sel. On suppose qu'en situation de stress salin imposant un déficit hydrique, l'association FLHORAG1 / clémentinier SRA92 et le mandarinier autotétraploïde présenteraient probablement une tolérance plus importante au sel. Il serait intéressant d'étudier les déterminants physiologiques et moléculaires en suivant la même procédure que la notre, mais en appliquant un stress salin imposant le déficit hydrique à l'ensemble des génotypes étudiés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams K. L., Percifield R., Wendel J. F. **2004**. Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics*, 168: 2217-2226.
- Agastian P., Kingsley S. J., and Vivekanandan M. **2000**. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica*, 38: 287-290.
- Agre P., Bonhivers M., Borgnia M. J. **1998**. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 14659-14662.
- Aharon R., Shahak Y., Wininger S., Bendov R., Kapulnik Y., and Galili G. **2003**. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *The Plant Cell*, 15: 439-447.
- Alia, Hayashi H., Chen T. H. H., Murata N. **1998a**. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of Arabidopsis during germination and early growth. *Plant Cell Environment*, 21: 232-239.
- Alia, Hayashi H., Sakamoto A., Murata N. **1998b**. Enhancement of the tolerance of Arabidopsis to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of betaine. *Plant Journal*, 16: 155-161.
- Alia P., Mohanty P., Matysik J. **2001**. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, 21: 195-200.
- Allakhverdiev S. I., Nishiyama Y., Miyairi S., Yamamoto H., Inagaki N., Kanesaki Y., and Murata N. **2002**. Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of psbA genes in Synechocystis. *Plant Physiology*, 130: 1443-1453.
- Allard R. W., Garcia P., Saenz-de-Miera and Perez de la Vega M. **1993**. Evolution of multilocus genetic structure in Avena hirtula and Avena barbata. *Genetics*, 135: 1125-1139.
- Apse M. P., Aharon G. S., Snedden W. A. and Blumwald E. **1999**. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in Arabidopsis. *Science*, 285: 1256-1258.
- Apse M. P., Sottosanto J. B., Blumwald E. **2003**. Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the Arabidopsis vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. *Plant Journal*, 36: 229-239.
- Arrigo A.-P. **1999**. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 936-944.

Asada K. **1994**. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In: *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, Foyer C. H. and Mullineaux P. M. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 77-104.

Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W.-L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M. and Sheen J. **2002**. MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415: 977-983.

Ayers R. S., and Westcot D. W. **1985**. Water quality for irrigation. *Irrigation and Drainage Paper*, 29, FAO, Rome.

Baker N. R. **1991**. A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 81: 563-570.

Bannister J. V., Bannister W. H., Rotilio G. **1987**. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase, *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 22 (2): 111-180.

Bañuls J. and Primo-Millo E. **1995**. Effects of salinity on some citrus scion–rootstock combinations. *Annals of Botany*, 76: 97-102.

Bañuls J., Serna M. D., Legaz F., Talon M., Primo-Millo E. **1997**. Growth and gas exchange parameters of Citrus plants stressed with different salts. *Journal of Plant Physiology*, 150: 194-199.

Barrett, **1992**. An autotetraploid of the key lime, *Citrus aurantifolia*. *Fruit varieties journal*, USA, 46 (3), 166-170.

Beidler J. L. Hilliard P., Rill R. L. **1982**. Ultrasensitive Staining of Nucleic Acids with Silver. *Analytical Biochemistry*, 126 (2): 374-380.

Belkhodja R., Morales F., Abadia A., Gomez-Aparisi J., and Abadia J. **1994**. Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology*, 104: 667-673.

Bellinger Y. and Larher F. **1987**. Proline accumulation in higher plants: a redox buffer? *Life Sciences Advances*, B, *Plant Physiology*, 6: 23-27.

Berthomieu P., Conéjéro G., Nublat A., Brackenbury W. J., Lambert C., Savio C., Uozumi N., Oiki S., Yamada K., Cellier F., Gosti F., Simonneau T., Essah P. A., Tester M., Véry A.-A., Sentenac H., and Casse F. **2003**. Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO Journal*, 22 (9): 2004-2014.

Beyer W., Imlay J., Fridovich I. **1991**. Superoxide dismutases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 40: 221-253.

Bienert G. P., Moller A. L. B., Kristiansen K. A., Schulz A., Moller I. M., Schjoerring J. K., Jahn T. P. **2007**. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 1183-1192.

Blatt, M. R., and Armstrong, F. **1993**. Potassium channels of stomatal guard cells: Abscissic acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH. *Planta*, 191: 330-341.

Blumwald E. and Poole R. **1985**. Na^+/H^+ -antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of Beta vulgaris. *Plant Physiology*, 78: 163-167.

Blumwald E. and Poole R. **1987**. Salt-tolerance in suspension cultures of sugar beet. I. Induction of Na^+/H^+ antiport activity at the tonoplast by grown in salt. *Plant Physiology*, 83: 884-887.

Bongi G. and Loreto F. **1989**. Gas-exchange properties of salt-stressed olive (*Olea europea* L.) leaves. *Plant Physiology*, 90: 1408-1416.

Bowler C., Montagu M. V., Inze D. **1992**. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 83-116.

Brugnoli E. and Bjorkman O. **1992**. Growth of cotton under continuous salinity stress influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta*, 187: 335-347.

Brugnoli E. and Lauteri M. **1991**. Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 non-halophytes. *Plant Physiology*, 95: 628-635.

Bustin S. A. **2000**. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193.

Camara-Zapata J. M., Garcia-Sanchez F., Martinez V., Nieves M., Cerda A. **2004**. Effect of NaCl on citrus cultivars. *Agronomie*, 24 (33): 155-160.

De Carvalho Costa M. A. P., de Almeida W. A. B., de Assis Alves Mourão Filho F., Januzzi Mendes B. M. and Martinelli Rodriguez A. P. **2004**. Stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplast fusion. *Pesq. agropec. bras.*, 39 (3): 297-300.

Casano L. M., Lascano H. R. and Trippi V. S. **1994**. Hydroxyl radicals and a thylakoid-bound endopeptidase are involved in light and oxygen-induced proteolysis in oat chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 35: 145-152.

Cerda A., Nieves M., and Guillen M. G. **1990**. Salt tolerance of lemon trees as affected by rootstock. *Irrigation Science*, 11: 245-249.

Chang L. and Karin M. **2001**. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410: 37-40.

Chapman H. D. **1968**. The mineral nutrition of *Citrus*, In: *The Citrus industry*, volume II, Reuther W., Batchelor L. D., Webber H.J. (Eds.), 127-274.

Chaumont F., Barrieu F., Jung R., Chrispeels M. J. **2000**. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiology*, 122: 1025-1034.

Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M. J., Jung R. **2001**. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology*, 125: 1206-1215.

Chen G. X. and Asada K. **1989**. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiology*, 30: 987-998.

Chen W. P. and Li P. H. **2002**. Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea mays* L.) cultured cells. *Plant, Cell and Environment*, 25: 955-962.

Chen W., Provart N. J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H. S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S. A., Budworth P. R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J. A., Harper J. F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J. L., Wang X., Zhu T. **2002**. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, 14: 559-574.

Chinnusamy V., Schumaker K., and Zhu J. K. **2004**. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55: 225-236.

Chomczynski P. and Sacchi N. **1987**. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156-159.

Cohen P. **1989**. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry*, 58: 453-508.

Colmenero-Flores J. M., Martinez G., Gamba G., Vazquez N., Iglesias D. J., Brumos J., Talon M. **2007**. Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants. *Plant Journal*, 50: 278-292.

Comai L., Tyagi A. P., Winter K., Holmes-Davis R., Reynolds S. H., Stevens Y., and Byers B. **2000**. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed Arabidopsis allotetraploids. *Plant Cell*, 12: 1551-1567.

Cook L. and Soltis P. **2000**. Mating systems of diploid and allotetraploid populations of Tragopogon (Asteraceae). II. Artificial populations. *Heredity*, 84: 410-415.

Cooper W. C. **1961**. Toxicity and accumulation of salts in citrus trees on various rootstocks in Texas. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 74: 95-104.

Cooper W. C., Gorton B. S., Olson E. O. **1952**. Ionic accumulation in citrus as influenced by rootstock and scion and concentration of salts and boron in the substrate. *Plant Physiology*, 27: 191-203.

Cutler A. and Krochko J. **1999**. Formation and breakdown of ABA. *Trends of Plant Science*, 4: 472-478.

Dai X., Xu Y., Ma Q., Xu W., Wang T., Xue Y., and Chong K. **2007**. Overexpression of a R1R2R3 MYB Gene, OsMYB3R-2, Increases Tolerance to Freezing, Drought, and Salt Stress in Transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology Preview*, DOI:10.1104/pp.106.094532.

Dalton D. A., Russell S. A., Hanus F. J., Pascoe G. A., Evans H. J. **1986**. Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 83: 3811-3815.

Daniels M. J., Mirkov T. E., Chrispeels M. J. **1994**. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel porotein TIP. *Plant Physiology*, 106: 1325-1333.

Dat J. F., Pellinen R., Van De Cotte B., Langebartels C., Kangasjärvi J., Inzé D., Van Breusegem F. **2003**. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant Journal*, 33: 621-632.

Davenport S. V., Gallego S. M., Benavides M. P. and Tomaro M. L. **2004**. Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation*, 40 (1): 81-88.

De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G., Frachisse J. M., Thomine S., Gambale F., Barbier-Brygoo H. **2006**. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, 442: 939-943.

De Carvalho Costa M. A. P., de Almeida W. A. B., Mourão Filho F. A. A., Januzzi Mendes B. M., Martinelli Rodriguez A. P. **2004**. Stomatal analysis of citrus somatic hybrids obtained by protoplast fusion. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39 (3), doi: 10.1590/S0100-204X2004000300015.

Delaney R. H. and Dobrenz A. K. **1974**. Morphological and anatomical features of alfalfa leaves as related to CO₂ exchange. *Crop Science*, 14: 444-447.

Delauney A. J., Hu C. A., Kishor P. B., Verma D. P. **1993**. Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by *trans*-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 268 : 18673-18678.

Dellagi A., Heilbronn J., Avrova A. O., Montesano M., Palva E. T., Stewart H. E., Toth I. K., Cooke D. E. L., Lyon G. D., Birch P. R. J. **2000**. A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 13: 1092-1101.

Demidchik V. and Maathuis F. J .M. **2007**. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*, 175: 387-404.

De Rocca Serra D. et Ollitrault P., **1992**. Les ressources génétiques chez les agrumes. Le courrier de l'environnement de l'INRA, *Sauve qui peut!*, 3 : 11-22.

Desikan R., Clarke A., Hancock J. T., Neill S. J. (1999). H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1863-1866.

Desikan, R., Hancock J. T., Coffey M. J., Neill S. J. **1996**. Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Letters*, 382: 213-217.

Desikan R., Mackerness S. A.-H., Hancock J. T. and Neill S. J. **2001**. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*, 127: 159-172.

D'Hont A., Grivet, L., Feldmann, P., Rao P., N. Berding and J.C. Glaszmann. **1996**. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics*, 250: 405-413.

Diédhiou C. J. and Golldack D. **2005**. Salt-dependent regulation of chloride channel transcripts in rice. *Plant Science*, 170 (4): 793-800.

Doi K., Gartner A., Ammerer G., Errede B., Shinkawa H., Sugimoto K., and Matsumoto K. **1994**. MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *EMBO Journal*, 13 (1): 61-70.

Donovan T. J. and Day A. D. **1969**. Some effects of high salinity on germination and emergence of barley (*Hordeum vulgare* L. emend Lam.). *Agronomy Journal*, 61: 236-238.

Dornhoff G. M. and Shibles R. M. **1976**. Leaf morphology and anatomy in relation to CO₂ exchange rate on soybean leaves. *Crop Science*, 16: 377-381.

Doyle J. J. and Doyle J. L. **1987**. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19: 11-15.

Ducieux G., Maillard P. and Sihachakr D. **1988**. Patterns of differentiation and regeneration in single cells and protoplasts of Sphacelaria (Phaeophyceae). In: *Algal Biotechnology*, Stadler T., Million J., Verdus M. C., Karamanos Y., Morvan H., Christian D. (Eds.), Elsevier, London, 139-150.

Dupont F. **1992**. Salt-induced changes in ion transport: regulation of primary pumps and secondary transporters. In: *Transport and receptor proteins of plant membranes*, Cooke D., Clarkson D., (eds.), Plenum Press, New York, 91-100.

Dure L. III. **1993**. A repeating 11-mer amino acid motif and plant dessication. *Plant Journal*, 3: 363-369.

Dure L. III, Greenway S. C., Galau G. A. **1981**. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*, 20: 4162-4168.

Dutzler R. **2004**. Structural basis for ion conduction and gating in ClC chloride channels. *FEBS Letters*, 564: 229-233.

Elgazzar A., Wallace A., and Hemaïdan N. **1965**. Sodium distribution in rough lemon and trifoliate orange seedlings. *Soil Science*, 99: 387-391.

Esen A. and Soost R. K. **1972**. Aneuploidy in Citrus. *The American Journal of Botany*, 59: 473-477.

Eulgem T., Rushton P. J., Robatzek S., Somssich I. E. **2000**. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Science*, 5: 199-206.

Everard J. D., Gucci R., Kann S. C., Flore J. A., and Loescher W. H. **1994**. Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiology*, 106: 281-292.

FAO. *Food and Agriculture Organization*. FAOSTAT database. Disponible sur: <http://faostat.fao.org/>

FAO-AQUASTAT. *Food and Agriculture Organization*. AQUASTAT database. Disponible sur: <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/main/indexfra.stm>

Feierabend J., Schaan C., Hertwig B. **1992**. Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiology*, 100: 1554-1561.

Ferreira A. L., Ferreira S., Duarte A. and Lima-Costa M. E. **2004**. Antioxidative response to salt stress in different NaCl-tolerant citrus cell lines. *Proceedings of the International Society of Citriculture II*, 634-638.

Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A. A. and Vega J. M. **1997**. Rapid elimination of Low-Copy DNA sequences in polyploidy wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics*, 147: 1381-1387.

Flexas J., Ribas-Carbó M., Hanson D. T., Bota J., Otto B., Cifre J., McDowell N., Medrano H., Kaldenhoff R. **2006**. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo. *Plant Journal*, 48: 427-439.

Foighil D. and Thiriot-Quievreux C. **1999**. Sympatric Australian Lasaea species (Mollusca : Bivalvia) differ in their ploidy levels, reproductive modes and developmental modes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 127: 477-494.

Fortin M. G., Morrisson N. A., and Verma D. P. S. **1987**. Nodulin-26, a peribacteroid membrane is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Research*, 15 (2): 813-824.

Foyer C. H., Lelandais M., Edwards E. A. and Mullineaux P. M. **1991**. Active oxygen, oxidative stress and plant metabolism: Current Topics in Plant Physiology (Pell E. and Steffen K. (eds), Am. Soc. *Plant Physiologists*: 131-144.

Foyer C. H., Lopez-Delgado H., Dat J. F., Scott I. M. **1997**. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum*, 100: 241-254.

Foyer C. H. and Noctor G. **2005**. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17: 1866-1875.

Fray R. G., Wallace A., Grierson D., Lycett G. W. **1994**. Nucleotide sequence and expression of ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant Molecular Biology*, 24: 539-543.

Froelicher Y., Dambier D., Bassene J.B., Costantino G., Lotfy S., Didout C., Beaumont V., Brottier P., Risterucci A.M., Luro F., Ollitrault P. **2008**. Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Resources*, 8 (1) : 119-122.

Fujiyoshi Y., Mitsuoka K., de Groot B.L., Philippsen A., Grubmüller H., Agre P. and Engel A. **2002**. Structure and function of water channels. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 509-515.

Fukuda A., Nakamura A., Tagiri A., Tanaka H., Miyao A., Hirochika H., Tanaka Y. **2004**. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiology*, 45: 149-159.

Gabbay-Azaria R., Tel-Or E., Schönfeld M. **1988**. Glycine betaine as an osmoregulant and compatible solute in the marine cyanobacterium *Spirulina subsalsa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 264: 333-339.

Gamble P. E. and Burke J. J. **1984**. Effects of water stress on the chloroplast antioxidant system. 1. Alterations in glutathione reductase activity. *Plant Physiology*, 76: 615-621.

Gao Y. P., Young L., Bonham-Smith P., Gusta L. V. **1999**. Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. *Plant Molecular Biology*, 40: 635-644.

Garcia-Leagz M. F., Ortiz J. M., Garcia-Lidon A., Cerda A. **1993**. Effect of salinity on growth, ion content and CO₂ assimilation rate in lemon varieties on different rootstocks. *International symposium on inorganic nitrogen assimilation N°3*, Tiberias , ISRAEL, 89 (3): 626-672.

Garrington T. P. and Johnson G. L. **1999**. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 11 (2): 211-218.

Gillham D. J. and Dodge A. D. **1986**. Hydrogen peroxide-scavenging systems within pea chloroplasts. A quantitative study. *Planta*, 167: 246-251.

Giraudat J., Parcy F., Bertauche N., Gosti F., Leung J., Moms P. C., Bouvier-Durand M. and Vartanian N. **1994**. Current advances in abscisic acid action and signaling. *Plant Molecular Biology*, 26: 1557-1577.

Glenn E. P., Brown J. J., and Blumwald E. **1999**. Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews of Plant Sciences*, 18: 227-256.

Gomez-Cadenas A., Arbona V., Jacas J., Primo-Millo E. and Talon M. **2003**. Absciscic acid reduces leaf abscission and increases salt tolerance in citrus plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21: 234-240.

Gomez-Cadenas A., Tadeo F. R., Primo-Millo E., and Talon M. **1998**. Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus seedlings to salt shock. *Physiologia Plantarum*, 103: 475-484.

Gomez-Cadenas A., Tadeo F. R., Talon M., Primo-Millo E. **1996**. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiology*, 112: 401-408.

Gómez J. M., Hernández J. A., Jiménez A., del Río L. A., Sevilla F. **1999**. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research*, 31: S11-S18.

Gosti F., Beaudoin N., Serizet C., Webb A. A. R., Vartanian N., Giraudat J. **1999**. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 11: 1897-1909.

Grabov A., Leung J., Giraudat J., Blatt M. R. **1997**. Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abi1-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant Journal*, 12: 203-213.

Graf T. (1992). Myb: a transcriptional activator linking proliferation and differentiation in hemopoietic cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2: 249-255.

Grosser J. W., Gmitter F. G., Sesto F., Deng X. X., and Chandler J. L. **1992**. Six new somatic *Citrus* hybrids and their potential for cultivar improvement. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117: 169-173.

Grosser J. W., Louzada E. S., Gmitter F. G. and Chandler J. L., **1994**. Somatic hybridization of complementary *Citrus* rootstocks: progress report. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society*, 108: 140-143.

Grosser J. W., Ollitrault P., and Olivares O. **2000**. Somatic hybridization in *Citrus*: an effective tool to facilitate variety improvement. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 36: 434-449.

Gubler F., Kalla R., Roberts J. K. and Jacobsen J. V. **1995**. Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pl [alpha] – amylase gene promoter. *Plant Cell*, 7: 1879-1891.

Guei R.G., Wassom C.E. **1993**. Genetics of osmotic adjustment in breeding maize for drought tolerance. *Heredity*, 71: 436-441.

Gueta-Dahan Y., Yaniv Z., Zilinskas B. A., Ben-Hayyim G. **1997**. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta*, 203 (4): 460-469.

Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J.-K. **2001**. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell*, 13: 1383-1400.

Guo Y., Qiu Q. S., Quintero F. J., Pardo J. M., Ohta M., Zhang C., Schumaker K. S., Zhua J. K. **2004**. Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16: 435-449.

Hagar H., Ueda N., and Shah S. V. **1996**. Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells. *American Journal of Physiology*, 271: 209-215.

Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. (1989). Free Radicals. In: *Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Press.

Hanba Y. T., Shibasaka M., Hayashi Y., Hayakawa T., Kasamo K., Terashima I. and Katsuhara M. **2004**. Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant, Cell and Physiology*, 45: 521-529.

Handa S., Handa A. K., Hasegawa P. M. and Bressan R. A. **1986**. Proline accumulation and the adaptation of cultured plants cells to water stress. *Plant Physiology*, 80: 938-945.

Hara M., Terashima S., Fukaya T., Kuboi T. **2003**. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta*, 217: 290-298.

Hara M., Terashima S., and Kuboi T. **2001**. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *Journal of Plant Physiology*, 158 (10): 1333-1339.

Hare P. D., Cress W. A. and Van Staden J. **1998**. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, 21: 535-553.

Hartung W. and Davies W. J. **1991**. Drought-induced changes in physiology and ABA. In: *Abscisic acid: physiology and biochemistry*, Davies W.J. and Jones H. G. (eds.), BIOS Scientific Publishers, Birmingham, UK, 63-79.

Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. **2000**. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-499.

Hayashi H., Alia, Sakamoto A., Nonaka H., Chen T. H. H., Murata N. **1998**. Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (codA) for choline oxidase. *Journal of Plant Research*, 111: 357-362.

Hechenberger M., Schwappach B., Fischer W. N., Frommer W. B., Jentsch T. J., Steinmeyer K. **1996**. A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional

complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 33632-33638.

Hemm M. R., Herrmann K. M. and Chapple C. **2001**. AtMYB4: a transcription factor general in the battle against UV. *Trends in Plant Science*, 6 (4): 135-136.

Hernández J. A., Corpas F. J., Gomez M., del Rio L. A., Sevilla F. **1993**. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 89: 103-110.

Hernández J. A., del Rio L. A. and Sevilla, F. **1994**. Salt stress-induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *New Phytologist*, 126: 37-44.

Hernández J. A., Jimenez A., Mullineaux P. and Sevilla F. **2000**. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment*, 23: 853-862.

Hernández, J. A., Olmos E., Corpas F. G., Sevilla F. and del Río L. A. **1995**. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*, 105: 151-167.

Hertwig B., Streb P., Feierabend J. **1992**. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiology*, 100: 1547-1553.

Holm L. M., Jahn T. P., Moller A. L., Schjoerring J. K., Ferri D., Klaerke D. A., Zeuthen T. **2005**. NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv*, 450: 415-428.

Hong C.-Y., Hsu Y. T., Tsai Y.-C. and Kao C. H. **2007**. Expression of ASCORBATE PEROXIDASE 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany*, 58 (12): 3273-3283.

Horie T. and Schroeder J. I. **2004**. Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiology*, 136: 2457-2462.

Hose E., Steudle E., Hartung W. **2000**. Absciscic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes. *Planta*, 211: 874-882.

Hoth S., Morgante M., Sanchez J.-P., Hanafey M. K., Tingey S. V., Chua N.-H. **2002**. Genome-wide expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science*, 115: 4891-4900.

Hu C-A. A., Delauney A. J., Verma D. P. S. **1992**. A bifunctional enzyme (delta'-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 89: 9354-9358.

Hu X., Bidney D. L., Yalpani N., Duvick J. P., Crasta O., Folkerts O., and Lu G. **2003**. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology*, 133: 170-181.

Huang T. and Duman J. G. **2002**. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Molecular Biology*, 48: 339-350.

Hundertmark M. and Hinch D. K. **2008**. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 9: 118.

Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., and Shinozaki K. **2000**. Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant Journal*, 24: 655-665.

Iglesias D. J., Levy Y., Gómez-Cadenas A., Tadeo F. R., Primo-Millo E., Talon M. **2004**. Nitrate improvement of growth in salt stressed citrus seedlings through effects on photosynthetic activity and chloride accumulation. *Tree Physiology*, 24: 1027-1034.

Ingram J. and Bartels D. **1996**. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 377-403.

Ishikawa F., Suga S., Uemura T., Sato M. H., Maeshima M. **2005**. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 579: 5814-5820.

Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. **2001**. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 27: 325-333.

Iuchi S., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. **2000**. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiology*, 123: 553-562.

Izzo R., Navari-Izzo F., Quartacci M. F., **1991**. Growth and mineral absorption in maize seedlings as affected by increasing NaCl concentrations. *Journal of Plant Nutrition*, 14: 687-699.

Jackson R. **1976**. Evolution and systematic significance of polyploidy. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7: 209-234.

Jang J. Y., Kim D. G., Kim Y. O., Kim J. S., Kang H. **2004**. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 54: 713-725.

Javot H. and Maurel C. **2002**. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*, 90: 301-313.

Jensen M. E. **1980**. Design and operation of farm irrigation systems. *American Society of Agricultural Engineers*, St. Joseph, MI, USA, 725 p.

Jentsch T. J., Stein V., Weinreich F. and Zdebik A. A. **2002**. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews*, 82 (2): 503-568.

Jin H. and Martin C. **1999**. Multifunctionality and diversity within the plant *MYB*-gene family. *Plant Molecular Biology*, 41: 577-585.

Johanson U., Karisson M., Gustavsson S., Sjoval S., Fraysse L., Weig A. R., Kjellbom P. **2001**. The complete set of genes encoding Major Intrinsic Proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for Major Intrinsic Proteins in plants. *Plant Physiology*, 126, 1358-1369.

Johansson I., Karlsson M., Johanson U., Larsson C., Kjellbom P. **2000**. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 324-342.

Johnson K. D., Höfte H., Chrispeels M. J. **1990**. An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF). *Plant Cell*, 2: 525-532.

Jolivet Y., Hamelin J., Larher F. **1983**. Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effects of glycine betaine and other related solutes against the oxalate destabilization of membranes in beet root cells. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 109: 171-180.

Jolivet Y., Larher F., Hamelin J. **1982**. Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effect of glycine betaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Science Letters*, 25: 193-201.

Jonak C., Ökrész L., Bögre L., Hirt H. **2002**. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 415-424.

Kashkush K., Feldman M., Levy A. A. **2003**. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics*, 33: 102-106.

Kato T. **1986**. Nitrogen metabolism and utilization in citrus. *Horticultural Reviews*, 8: 181-216.

Katsuhara M., Akiyama Y., Koshio K., Shibasaka M., Kasamo K. **2002**. Functional analysis of water channels in barley roots. *Plant Cell Physiology*, 43: 885-893.

Katsuhara M. and Hanba Y. T. **2008**. Barley plasma membrane intrinsic proteins (PIP aquaporins) as water and CO₂ transporters. Okayama University. Disponible sur: <http://escholarship.lib.okayama-u.ac.jp/physiology/1>.

Katsuhara M., Koshio K., Shibasaka M., Hayashi Y., Hayakawa T. and Kasamo K. **2003**. Overexpression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant and Cell Physiology*, 44: 1378-1383.

Kaur J. and Duffus C. **1989**. The effect of sodium fluoride on cereal seed germination and seedling growth. *Plant, Cell and Environment*, 12: 155-161.

Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D., Bohnert H. J. **2001**. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell*, 13: 889-905.

Kishor P. B. K., Hong Z., Miao C.-H., Hu C.-A. A., and Verma D. P. S. **1995**. Overexpression of Delta1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108: 1387-1394.

Kliebenstein D. J., Monde R.-A., and Last R. L. **1998**. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*, 118: 637-651.

Kocsy G., Brunner M., Rügsegger A., Stamp P., Brunold C. **1996**. Glutathione synthesis in maize genotypes with different sensitivity to chilling. *Planta*, 198: 365-370.

Kocsy G., Owttrim G., Brander K., Brunold C. **1997**. Effect of chilling on the diurnal rhythm of enzymes involved in protection against oxidative stress in a chilling tolerant and a chilling sensitive maize genotype. *Physiologia Plantarum*, 99: 249-254.

Kocsy G., Szalai G., Vágújfalvi A., Stéhli L., Orosz G., Galiba G. **2000**. Genetic study of glutathione accumulation during cold hardening in wheat. *Planta*, 210: 295-301.

Kovtun Y., Chiu W.-L., Tena G., Sheen J. **2000**. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 97: 2940-2945.

Krall J. P., Edwards G. E., Andreo C. S. **1989**. Protection of pyruvate, Pi dikinase from maize against cold lability by compatible solutes. *Plant Physiology*, 89: 280-285.

Krug C. A. **1943**. Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae with special reference in the genus *Citrus*. *Citrus Botanical Gazette*, 104: 602-611.

Kunert K. J. and Foyer C. H., **1993**. Sulphur nutrition and assimilation in higher plants: Regulatory, agricultural and environmental aspects. De Kok L. J. *et al.* (eds.), SPB Academic Publishers, The Hague, 139-151.

Kwon S. I., Lee H. and An C. S. **2007**. Differential expression of three catalase genes in the small radish (*Rhaphanus sativus* L. var. *sativus*). *Molecular Cells*, 24 (1): 37-44.

Laborem G. E., Wagner M. and Reyes F. **1991**. Concentracion de prolina como indicador de déficit hidrico en tres patrones citricos. *Fruits*, 46: 259-264

Lamb C., and Dixon R. A. **1997**. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 251-275.

LaRosa P. C., Hasegawa P. M., Rhodes D., Clithero J. M., Watad A-E. A., Bressan R. A. **1987**. Absciscic acid stimulated osmotic adjustment and its involvement in adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology*, 85: 174-181.

Lee H-S. and Chen Z. J. **2001**. Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 98: 6753-6758.

Leitch A. R. and Leitch I. J. **2008**. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*, 320: 481-483.

Lessani H. and Marschner H. **1978**. Relation between salt tolerance and long-distance transport of sodium and chloride in various crop species. *Australian Journal of Plant Physiology*, 5: 27-37

Leung J., Merlot S., Giraudat J. **1997**. The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID INSENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in absciscic acid signal transduction. *Plant Cell*, 9: 759-771.

Lewis, W. H. **1980**. Polyploidy in species populations. In: *Polyploidy, Biological Relevance*, Lewis W. H. (ed.), Plenum Press, New York, pp 104–143.

Lihova J., Tribsch A. and Marhold K. **2003**. The Cardamine pratensis (Brassicaceae) group in the Iberian Peninsula: taxonomy, polyploidy and distribution. *Taxon*, 52: 783-801.

Liotenberg S., North H., Marion-Poll A. **1999**. Molecular biology of absciscic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37: 341-350.

Liu Q., Scaringe W. A. and Sommer S. **2000**. Discrete mobility of single-stranded DNA in non-denaturing gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 28: 940-943.

Liu J. and Zhu J. K. **1997**. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 114: 591-596.

Liu J. and Zhu J-K. **1998**. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science*, 280: 1943-1945.

Lloyd J., Kriedemann P., Aspinall D. **1990**. Contrasts between *Citrus* species in response to salinization: an analysis of photosynthesis and water relation for different rootstock-scion combinations. *Physiologia Plantarum*, 78: 236-246.

Longley A. E. **1926**. Triploid citrus. *Journal of Washington Academy of Science*, 16: 543-545.

Loque D., Ludewig U., Yuan L., Von Wiren N. **2005**. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiology*, 137: 671-680.

Lukens L. N., Pires J., C., Leon E., Vogelzang R., Oslach L., Osborn T. **2006**. Patterns of sequence loss and cytosine methylation within a population of newly resynthesized *Brassica napus* allopolyploids. *Plant Physiology*, 140: 336-348.

Lumaret R. **1988**. Adaptative strategies and ploidy levels. *Acta Aecologica*, 9: 83-93.

Lurin C., Geelen D., Barbier-Brygoo H., Guern J., Maurel C. **1996**. Cloning and functional expression of a plant voltage dependent chloride channel. *Plant Cell*, 8: 701-711.

Maathuis F., Filatov V., Herzyk P., Krijger G. C., Axelsen K. B., Chen S., Green B. J., Li Y., Madagan K. L., Sanchez-Fernandez R., Forde B. G., Palmgren M. G., Rea P. A., Williams L. E., Sanders D. and Amtmann A. **2003**. Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Plant Journal*, 35: 675-692.

Maathuis F. J. M. and Sanders D. **2001**. Sodium uptake in *Arabidopsis thaliana* roots is regulated by cyclic nucleotides. *Plant Physiology*, 127: 1617-1625.

Maas E. V., Hoffman G. J. **1977**. Crop salt tolerance-current assessment. Journal of the Irrigation and Drainage Division. *Proceedings of the American Society of Civil Engineers*, 103 (IR2): 115-134.

Maas E. V. **1993**. Salinity and citriculture. *Tree Physiology*, 12 (2): 195-216.

Mademba-Sy F. **2004**. Contribution à la recherche d'indicateurs physiologiques et biochimiques de la tolérance des agrumes à la salinité. Mémoire de thèse, Université de Rennes I, 164 p.

Mademba-Sy F., Bouchereau A. and Larher F. R. **2003**. Proline accumulation in cultivated citrus and its relationship with salt tolerance. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78 (5): 617-623.

Maeda T., Wurgler-Murphy S. M., Saito H. **1994**. A two component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369: 242-245.

Mann T. and Kleilin, D. **1938**. Homocuprein and heptacuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proceedings of Royal Society, London B.*, 126: 303-315.

MAPK Group. **2002**. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends of Plant Science*, 7: 301-308.

Mariaux J. B., Bockel C., Salamini F., Bartels D. **1998**. Dessication-and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology*, 38: 1089-1099.

Marmagne A., Vinauger-Douard M., Monachello D., de Longevialle A. F., Charon C., Allot M., Rappaport F., Wollman F-A., Barbier-Brygoo H. and Ephritikhine G. **2007**. Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *Journal of Experimental Botany*, 58 (12): 3385-3393.

Martelotto L. G., Ortiz J. P . A., Stein J., Espinoza F., Quarin C. L. and Pessino S. C. **2005**. A comprehensive analysis of gene expression alterations in a newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid. *Plant Science*, 169 (1) : 211-220.

Martinez-Ballesta M. C., Aparicio F., Pallas V., Martinez V., Carvajal M. **2003**. Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, 160: 689-697.

Martre P., Morillon R., Barrieu F., North G. B., Nobel P. S., and Chrispeels M. J. **2002**. Plasma Membrane Aquaporins Play a Significant Role during Recovery from Water Deficit. *Plant Physiology*, 130: 2101-2110.

Masojidek J. and Hall D. O. **1992**. Salinity and drought stresses are amplified by high irradiance in sorghum. *Photosynthetica*, 27: 159-171.

Masterson J. **1994**. Stomatal size in fossil plants: Evidence of polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 264 (5157): 421-424.

McCord J. M. and Fridovitch I. **1969**. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (humocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244 (22): 6049-6065

McKersie B. D. **1996**. Oxidative stress. Disponible sur: <http://www.agronomy.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm#contents>).

McLysaght A., Hokamp K., Wolfe K. **2002**. Extensive genome duplication during early chordate evolution. *Nature Genetics*, 31: 200-204.

Mishra S. K., Subrahmanyam D., and Singhal G. S. **1991**. Interrelationship between salt and light stress on primary processes of photosynthesis. *Plant Physiology*, 138: 92-96.

Mittova V., Guy M., Tal M. and Volokita M. **2004**. Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1105-1113.

Miyake C. and Asada K. **1992**. Thylakoïd-bound ascorbate peroxydase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoïds. *Plant Cell Physiology*, 33: 541-553.

Miyake C., Cao W. H. and Asada K. **1993**. Purification and molecular properties of the thylakoïd-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant cell Physiology*, 34: 881-889.

Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., and Shinozaki K. **1996**. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 93: 765-769.

Molinari H. B. C., Marur C. J., Bessalho Filho J. C., Kobayashi A. K., Pileggi M., Júnior R. P. L., Pereira L. F. P. and Vieira L. G. E. **2004**. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Science*, 167 (6): 1375-1381.

Moller I. M. **2001**. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 561-591

Moons A., Bauw G., Prinsen E., Van Montagu M., Straeten D. V. D. **1995**. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties. *Plant Physiology*, 107: 177-186.

Morales F., Abadia A., Gomez-Aparis J., and Abadia J. **1992**. Effects of combined NaCl and CaCl₂ salinity on photosynthetic parameters of barley grown in nutrient solution. *Physiologia Plantarum*, 86: 419-426.

Morillon R. and Chrispeels M. J. **2001**. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 98 (24): 14138-14143.

Moya J. L., Gómez-Cadenas A., Primo-Millo E., Talon M. **2003**. Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water usage. *Journal of Experimental Botany*, 54: 825-833.

Mullineaux P., Ball L., Escobar C., Karpinska B., Creissen G. and Karpinski S. **2000**. Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of arabidopsis antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Science*, 355 (1402): 1531-1540.

Mullineaux P. M., Karpinski S., Jimenez A., Cleary S. P., Robinson C., Creissen G. P. **1998**. Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase. *Plant Journal*, 13: 375-379.

Murata N., Mohanty P. S., Hayashi H. and Papageorgiou G. C. **1992**. Glycinebetaine stabilizes the association of extrinsic proteins with the photosynthetic oxygen-evolving complex. *FEBS Letters*, 296: 187-189.

Murata Y., Pei Z. M., Mori I. C., Schroeder J. **2001**. Absciscic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NADPH and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell*, 13: 2513-2523.

Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. **2005**. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science*, 10: 339-346.

Nakamura A., Fukuda A., Sakai S., and Tanaka Y. **2005**. Molecular Cloning, Functional Expression and Subcellular Localization of Two Putative Vacuolar Voltage-Gated Chloride Channel in Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology*, 47 (1): 32-42.

Nakano Y. and Asada K. **1981**. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiology*, 21: 1295-1307.

Nambara E. and Marion-Poll A. **2005**. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 165-185.

Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. **1999**. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 461: 205-210.

Naot D., Ben-Hayyim G., Eshdat Y. and Holland D. **1995**. Drought, heat and salt stress induce the expression of a citrus homologue of an atypical late-embryogenesis Lea5 gene. *Plant Molecular Biology*, 27 (3): 619-622.

Naqvi S. S. M. **1995**. Plant growth hormones: Growth promoters and inhibitors. Handbook of Plant and Crop Physiology.

Nieves M., Cerdà A. and Botella M. **1991**. Salt tolerance of two lemon scions measured by leaf chloride and sodium accumulation. *Journal of Horticultural Science*, 65: 359-366.

Nolte K. D., Hanson A. D. and Gage D. A. **1997**. Proline accumulation and methylation to proline betaine in *Citrus*: implications for genetic engineering of stress resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121: 8-13.

Nuccio M. L., Russell B. L., Nolte K. D., Rathinasabapathi B., Gage D. A. and Hanson A. D. **1998**. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant Journal*, 16 (4): 487.

Ollitrault P., Dambier D., Froelicher Y., Carreel F., D'Hont A., Luro F., Bruyère S., Cabasson C., Lotfy F., Joumaa A., Vanel F., Maddi F., Treanton K. and Grisoni M. **2000**. Apport de l'hybridation somatique pour l'exploitation des ressources génétiques des agrumes. *Cahiers Agricultures*, 9: 223-236.

Ollitrault P. et Faure X. **1992**. Système de reproduction et organisation de la diversité génétique dans le genre *Citrus*. In : *Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes*. Paris, France, BRG, p. 131-151.

Options méditerranéennes-CIHEAM. 1975. Connaissance des écosystèmes des zones semi-arides et arides et de l'Afrique du Nord : orientation des recherches écologiques en vue du développement. Rapport du Comité Français du M.A.B pour la réunion PNUE, Téhéran. Disponible sur : <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/r28/CI010610.pdf>

Oracz K., Bouteau H. E. M, Farrant J. M., Cooper K., Belghazi M., Job C., Job D., Corbineau F., Bailly C. **2007**. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant Journal*, 50: 452-465.

Otto S. and Whitton J. **2000**. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, 34: 401-437.

Ouerghi Z., Cornie G., Roudani M., Ayadi A., and Brulfert J. **2000**. Effect of NaCl on the photosynthesis of two wheat species (*Triticum durum* and *Triticum aestivum*) differing in their sensitivity to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 15: 519-527.

Pabo C. O., Peisach E., Grant R. A. **2001**. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 70: 313-340.

Papp J. C., Ball M. C., and Terry N. **1983**. A comparative study of the effects of NaCl salinity on respiration, photosynthesis, and leaf extension growth in *Beta vulgaris* L. (sugar beet). *Plant Cell Environment*, 6: 675-677.

Parida A. K., Das A. B. and Mittra B. **2003**. Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts. *Photosynthetica*, 41: 191-200.

Pastori G. M., Kiddle G., Antoniow J., Bernard S., Veljovic-Jovanovic S., Verrier P. J., Noctor G. and Foyer C. H. **2003**. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell*, 15: 939-951.

Peiter E., Maathuis F. J. M., Mills L. N., Knight H., Pelloux M., Hetherington A. M., Sanders D. **2005**. The vacuolar Ca^{2+} -activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature*, 434: 404-408.

Perl A., Perl-Treves R., Galili S., Aviv D., Shalgi E., Malkin S., Galun E. **1993**. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn superoxide dismutases. *Theoretical and Applied Genetics*, 85 (5): 568-576.

Piqueras A., Hernandez J. A., Olmos E., Hellin E., Sevilla F. **1996**. Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of *Citrus* cells to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45: 53-60.

Pires J. C., Zhao J., Schranz M. E., Leon E. J., Quijada P. A., Lukens L., Osborn T. C. **2004**. Flowering time divergence and genomic rearrangements in resynthesized polyploids (*Brassica*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 675-688.

Pnueli L., Liang H., Rozenberg M. and Mittler R. **2003**. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant Journal*, 34: 187-203.

Polle A., Chakrabarti K., Schurmann W. and Rennenberg H. **1990**. Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing system in extra cellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst). *Plant Physiology*, 94: 312-319.

Pontes O., Neves N., Silva M., Lewis M. S., Madlung A., Comai L., Viegas W., Pikaard C. S. **2004**. Chromosomal locus rearrangements are a rapid response to formation of the allotetraploid *Arabidopsis succica* genome. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 101: 18240-18245.

Popova L. P., Stoinova Z. G., Maslenkova L. T. **1995**. Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14: 211-218.

Porat R., Pavoncello D., Ben-Hayyim G., Lurie S. **2002**. A heat treatment induced the expression of a Na^+/H^+ antiport gene (*cNHX1*) in citrus fruit. *Plant Science* 162: 957-963.

Prasad G. V. R., Coury L. A., Finn F., and Zeidel M. L. **1998**. Reconstituted Aquaporin 1 water channels transport CO_2 across membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (50), 33123-33126.

Purvis A. C. and Yelenosky G. **1983**. Translocation of carbohydrates and proline in young grapefruit trees at low temperatures. *Plant Physiology*, 73: 877-880.

Quigley F., Rosenberg J. M., Shachar-Hill Y., Bohnert H. J. **2001**. From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biology*, 3: 1-17

Qin X. and Zeevaart J. A. D. **2002**. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology*, 128: 544-551.

Quintero F. J., Ohta M., Shi H., Zhu J. K. and Pardo, J. M. **2002**. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na^+ homeostasis. *of National Academy of Science*, USA, 99: 9061-9066.

Qiu Q. S., Guo Y., Quintero F. J., Pardo J. M., Schumaker K. S., Zhu J. K. **2004**. Regulation of vacuolar Na^+/H^+ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the SOS pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 207-215.

Rabinowicz P. D., Braun E. L., Wolfe A. D., Bowen B., Grotewold E. **1999**. Maize R2R3 *Myb* genes: sequence analysis reveals amplification in higher plants. *Genetics*, 153: 427-444.

Reddy M. P., Sanish S., and Iyengar E. R. R. **1992**. Photosynthetic studies and compartmentation of ions in different tissues of *Salicornia brachiata* Roxb. under saline conditions. *Photosynthetica*, 26: 173-179.

Ried J. L. and Walker-Simmons M. K. **1993**. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*, 102: 125-131.

Rizhsky L., Davletova S., Liang H., Mittler R. **2004**. The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 11736-11743.

Robatzek S. and Somssich I. E. **2001**. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant Journal*, 28 (2): 123-133.

Robinson S. P., Downton W. J. S., and Millhouse J. **1983**. Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach. *Plant Physiology*, 73: 238-242.

Rodrigo M. J., Alquezar B., Zacarías L. **2006**. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Experimental Botany*, 57: 633-643.

Rodriguez P. L., Leube M. P., Grill E. **1998**. Molecular cloning in *Arabidopsis thaliana* of a new protein phosphatase 2C (PP2C) with homology to ABI1 and ABI2. *Plant Molecular Biology*, 38: 879-883.

Romero-Aranda R., Bondada B. R., Syvertsen J. P., Grosser J. W. **1997**. Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid Citrus. *Annals of Botany*, 79: 153-160.

Romero-Aranda R., Moya J. L., Tadeo F. R., Legaz F., Primo-Millo E. and Talon M. **1998**. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant, Cell and Environment*, 21: 1243-1253.

Rubio F., Flores P., Navarro J. M., Martinez V. **2003**. Effects of Ca^{2+} , K^{+} and cGMP on Na^{+} uptake in pepper plants. *Plant Science*, 165: 1043-1049.

Sakamoto A. and Murata N. **2002**. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, 25: 163-171

Sakamoto H., Maruyama K., Sakuma Y., Meshi T., Iwabuchi M., Shinozaki K., and Yamaguchi-Shinozaki K. **2004**. Arabidopsis Cys2/His2-Type Zinc-Finger Proteins Function as Transcription Repressors under Drought, Cold, and High-Salinity Stress Conditions. *Plant Physiology*, 136: 2734-2746.

Samuel M. A., Miles G. P., Ellis B. E. **2000**. Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant Journal*, 22: 367-376.

Sakamoto H., Maruyama K., Sakuma Y., Meshi T., Iwabuchi M., Shinozaki K. Yamaguchi-Shinozaki K. **2004**. Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiology*, 136: 2734-2746.

Sakamoto A. and Murata N. **2002**. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environment*, 25: 163-171.

Sakurai J., Ishikawa F., Yamaguchi T., Uemura M., and Maeshima M. **2005**. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant and Cell Physiology*, 46 (9): 1568-1577.

Saleh B. **2005**. Contribution à l'étude des déterminants physiologiques, génétiques et moléculaires de la tolérance des agrumes à la salinité. Mémoire de thèse, ENSA de Montpellier, 131p.

Salmon A., Ainouche M. L., Wendel J. F. **2005**. Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology*, 14: 1163-1175.

Sandalio L. M., del Río L. A. **1988**. Intraorganellar distribution of SOD in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiology*, 88: 1215-1218.

Saneoka H., Nagasaka C., Hahn D. T., Yang W.-J., Premachandra G. S., Joly R. J. and Rhodes D. **1995**. Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. *Plant Physiology*, 107: 631-638.

Saradhi A. and Saradhi P. P. **1991**. Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 138: 554-558.

Scandalios J. G. **1990**. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advanced Genetics*, 28: 1-41.

Scandalios J. G. **1993**. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 101: 7-12.

Schäffner A. R. **1998**. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta*, 204: 131-139.

Schranz M., Osborn T. **2000**. Novel flowering time variation in the resynthesized polyploid *Brassica napus*. *Journal of Heredity*, 91: 242-246.

Seemann J. R. and Critchley C. **1985**. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 164: 151-162.

Segraves K. and Thompson J. **1999**. Plant polyploidy and pollination: Floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution*, 53: 1114-1127.

Seki M., Narusaka M., Ishida J., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y. and Shinozaki K. **2002**. Monitoring the expression

profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal*, 31: 279-292.

Shabala S., Demidchik V., Shabala L., Cuin T. A., Smith S. J., Miller A. J., Davies J. M., Newman I. A. **2006**. Extracellular Ca^{2+} ameliorates NaCl-induced K^{+} loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K^{+} -permeable channels. *Plant Physiology*, 141: 1653-1665.

Shi H., Ishitani M., Kim C., Zhu J.-K. **2000**. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter. *Proceedings National Academy of Science, USA*, 97: 6896-6901.

Shi H., Lee B.-H., Wu S.-J., Zhu J.-K. **2003**. Overexpression of a plasma membrane $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21 (1): 81-85.

Shi W. M., Muramoto Y., Ueda A. and Takabe T. **2001**. Cloning of peroxidase gene from barely and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 273 (1): 23-27.

Shi H., Quintero F. J., Pardo J. M., Zhu J. K. **2002**. The putative plasma membrane $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ antiporter *SOS1* controls long-distance Na^{+} transport in plants. *Plant Cell*, 14: 465-477.

Shou H., Bordallo P., and Wang K. **2004**. Expression of the *Nicotiana* protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *Journal of Experimental Botany*, 55 (399): 1013-1019.

Sivamani E., Bahieldin A., Wraith J. M., Al-Niemi T., Dyer W. E., Ho T.-H. D., Qu R. **2000**. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. *Plant Science*, 155: 1-9.

Skriver K. and Mundy J. **1990**. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 2: 503-512.

Slooten L., Capiou K., Van Camp W., Van Montagu M., Subesma C. and Inze D. **1995**. Factors affecting the enhancements of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiology*, 107: 737-750.

Smirnoff N. **2000**. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 229-235.

Smirnoff N. and Cumbes Q. J. **1989**. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057-1060.

Smirnoff N. and Gressel N. J. **1988**. Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. *Journal of Experimental Botany*, 39: 1097-1108.

Song K., Lu P., Tang K., and Osborn T. C. **1995**. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploidy evolution. *Proceedings of National Academy of Science*, 92: 7719-7723.

Spiegel-Roy P. and Goldschmidt E. E. 1996. Biology of citrus. In: *Biology of horticultural crops*, Cambridge University Press, Australia, 185-210.

Spollen W. G., Sharp R. E., Saab I. N., Wu Y. **1993**. Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. In: *Water deficits, plant responses from cell to community*, Smith J. A. C. and Griffiths H. (Eds.), Oxford: Bios Scientific Publishers, 37-52.

Steudle E. and Peterson C. A. **1998**. How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany*, 49: 775-788.

Storchova Z., Breneman A., Cande J., Dunn J., Burbank K., O'Toole E. and Pellman D. **2006**. Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature*, 443: 541-547.

Storey R. and Walker R. R. **1999**. Citrus and salinity. *Scientia Horticulturae*, 78 : 39-81.

Stracke R., Werber M., Weisshaar B. **2001**. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 447-456.

Stupar R. M., Bhaskar P. B., Yandell B. S., Rensink W. A., Hart A. L., Ouyang S., Veilleux R. E., Busse J. S., Erhardt R. J., Buell C. R., and Jiang J. **2007**. Phenotypic and transcriptomic changes associated with potato autopolyploidisation. *Genetics*, 176: 2055-2067.

Subbarao G. V., Wheeler R. M., Levine L. H. and Stutte G. W. **2001**. Glycine betaine accumulation, ionic and water relations of red-beet at contrasting levels of sodium supply. *Journal of Plant Physiology*, 158 (6): 767-776.

Suga S., Komatsu S., Maeshima M. **2002**. Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 43: 1229-1237.

Swingle W. T., Reece P. C. **1967**. The botany of citrus and its wild relatives. In: *The Citrus Industry*, Reuther W., Batchelor L. D., and Webber H. J. (eds.), University of California, Berkeley, 1: 190-430.

Sykes S. R. **1985**. Effects of seedling age and size on chloride accumulation by juvenile *Citrus* seedlings treated with sodium chloride under glasshouse conditions, *Australian Journal of Experimental Botany*, 25: 943-953.

Syvvertsen J. P., Lee L. S., Grosser J. W. **2000**. Limitations on growth and net gas exchange of diploid and tetraploid Citrus rootstock cultivars grown at elevated CO₂. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 125: 228-234.

Talke I. N., Blaudez D., Maathuis F. J. M., Sanders D. **2003**. CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends in Plant Science*, 8: 286-293.

Tan B. C., Joseph L. M., Deng W. T., Liu L., Li Q. B., Cline K., McCarty D. R. **2003**. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant Journal*, 35: 44-56.

Tanaka T. **1961**. Citrologia: semi centennial commemoration papers of Citrus studies. Citrologia supporting fondation, Osaka, Japan. 114 p.

Tanaka K., Suda Y., Kondo N., and Sugahara K. **1985**. Ozone tolerance and the ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 26: 1425-1431.

Tanaka K., Saji H. and Kondo N. **1988**. Immunological properties of spinach glutathione reductase and inductive biosynthesis of the enzyme with ozone. *Plant Cell Physiology*, 29: 637-642.

Tanaka K., Machida T. M. and Sugimoto T. **1990**. Ozone tolerance and glutathione reductase in tobacco cultivars. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54: 1061-1062.

Tanaka K., Takeuchi E., Kubo A., Sakaki T., Haraguchi K., Kawamura Y. **1991**. Two immunologically different isozymes of ascorbate peroxidase from spinach leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 286: 371-375.

Taylor I. B., Burbidge A., Thompson A. J. **2000**. Control of abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1563-1574.

Temesvariné Edit Abraham. **2004**. Study of proline accumulation and transcriptional regulation of genes evolved in this process in *Arabidopsis thaliana*. Mémoire de these, Hungarian Academy of Sciences.

Termaat A. and Munns R. **1986**. Use of concentrated macronutrient solutions to separate osmotic from NaCl-specific effects on plant growth. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 509-522.

Thomashow M. F. **1999**. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 571-599.

Thompson A. J., Jackson A. C., Symonds R. C., Mulholland B. J., Dadswell A. R., Blake P. S., Burbidge A., Taylor I. B. **2000**. Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant Journal*, 23: 363-374.

Tozlu I., Moore G. A., Guy C. L. **2000**. Effects of increasing NaCl concentration on stem elongation, dry mass production, and macro- and micro-nutrient accumulation in *Poncirus trifoliata*. *Plant Physiology*, 27: 35-42.

Turner N. C. **1997**. Further progress in crop water relations. *Advanced Agronomy*, 58: 293-338.

Turner N. C., Wright G. C., Siddique K. H. M. **2001**. Adaptation of grain legume to water-limited environments. *Advanced Agronomy*, 71: 193-231.

Ueda A., Kathiresan A., Inada M., Narita Y., Nakamura T., Shi W., Takabe T. and Bennett J. **2004**. Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. *Journal of Experimental Botany*, 55 (406): 2213-2218.

Udall J. A. and Wendel J. F. **2006**. Polyploidy and crop improvement. *Crop Science*, 46: S3-S14.

Ulm R., Ichimura K., Mizoguchi T., Peck S. C., Zhu T., Wang X., Shinozaki K., and Paszkowski J. **2002**. Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *The EMBO Journal*, 21 (23): 6483-6493.

Uozumi N., Kim E. J., Rubio F., Yamagushi T., Muto S., Tsuboi A., Bakker E. P., Nakamura T., and Schroeder J. I. **2000**. The *Arabidopsis* HKT1 gene homolog mediates inward Na⁺ currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology*, 122: 1249-1260.

Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao S., Shinozaki K. **1993**. An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 5 (11): 1529-1539.

Ushimaru T., Nakagawa T., Fujioka Y., Daicho K., Naito M., Yamauchi Y., Nonaka H., Amako K., Yamawashi K., Murata N. **2006**. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydrascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 163 (11): 1179-1184.

Van Camp W., Capiou K., Van Montagu M., Inze D. and Slooten L. **1996**. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology*, 112: 1703-1714.

Vandenabeele S., Van Der Kelen K., Dat J., Gadjev I., Boonefaes T., Morsa S., Rottiers P., Slooten L., Van Montagu M., Zabeau M., Inze D. and Van Breusegem F. **2003**. A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 100 (26): 16113-16118.

Vandenabeele S., Vanderauwera S., Vuylsteke M., Rombauts S., Langebartels C., Seidlitz H. K., Zabeau M., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. **2004**. Catalase deficiency drastically affects high light-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 39: 45-58.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., and Kuiper M. **1995**. AFLP: a new technique of DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21): 4407-4414.

Vranova E., Atichartpongkul S., Villarroel R., Van Montagu M., Inze D. and Van Camp W. **2002**. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 99: 10870-10875.

Walker R. R., Torokfalvy E., Downton J. S. **1982**. Photosynthetic responses of the *Citrus* varieties Rangpur lime and Etrog citron to salt treatment. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9: 783-790.

Walker R. R. and Douglas T. J. **1983**. Effect of salinity on uptake and distribution of chloride, sodium and potassium ions in Citrus plants. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34: 145-153.

Walker M. A and McKersie B. D. **1993**. Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *Journal of Plant Physiology*, 141: 234-239.

Walker R. R., Törökfalvy E., Grieve A. M., Prior L. D. **(1983)**. Water relations and ion concentrations of leaves on salt-stressed Citrus plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 10: 265-277.

Walters D. R. **2003**. Polyamines and plant disease. *Phytochemistry*, 64: 97-107.

Wan X. and Li L. **(2006)**. Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347: 1030-1038.

Wang H., Miyazaki S., Kawai K., Deyholos M., Galbraith D., Bohnert H. **2003b**. Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots. *Plant Molecular Biology*, 52: 873-891.

Wang J., Tian L., Lee H-S., Wei N. E., Jiang H., Watson B., Madlung A., Osborn T. C., Doerge R.W., Comai L., and Chen J. **2006**. Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allatetraploids. *Genetics*, 172: 507-517.

Wang W., Vinocur B., Altman A. **2003a**. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218: 1-14.

Wang J-Y., Xia X-L., Wang J-P and Yin W-L. **2008**. Stress responsive Zinc-finger protein gene of *Populus euphratica* in tobacco enhances salt tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50 (1): 56-61.

Warner D. A. and Edwards G. E. **1989**. Effects of polyploidy on photosynthetic rates, photosynthetic enzymes, contents of DNA, chlorophyll, and sizes and numbers of photosynthetic cells in the C₄ Dicot *Atriplex confertifolia*. *Plant Physiology*, 91 (3): 1143-1151.

Weig A., Deswarte C., Chrispeels M. J. **1997**. The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiology*, 114: 1347-1357.

Wendel J. F., Schnabel A., Seelanan T. **1995**. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of National Academy of Science, USA*, 92: 280-284.

Weston K. **1999**. Reassessing the role of C-MYB in tumorigenesis. *Oncogene*, 18 (19): 3034-3038.

Wingate V. P. M., Lawton M. A., Lamb C. J. **1988**. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiology*, 87: 206-210.

Wolfe K. H. and Shields D. C. **1997**. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387: 708-713.

Wurgler-Murphy S. M., Maeda T., Witten E. A., and Saito H. **1997**. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Molecular and Cellular Biology*, 17 (3), 1289-1297.

Xin Z. and Li P. H. **1993**. Relationship between proline and abscisic acid in the induction of chilling tolerance in maize suspension cultured cells. *Plant Physiology*, 103: 607-613.

Xiong L., Schumaker K. S. and Zhu J-K. **2002**. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14: S165-S183.

Xiong L. and Zhu J. **2003**. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 133: 29-36.

Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T-H.D., Wu R. **1996**. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology*, 110: 249-257.

Yang S. S., Cheung F., Lee J. J., Ha M., Wei N. E., Sze S-H., Stelly D. M., Thaxton P., Triplett B., Town C. D. and Chen J. **2006**. Accumulation of genome-specific transcripts,

transcription factors and phytohormonal regulators during early stages of fiber cell development in allotetraploid cotton. *Plant Journal*, 47, 761-775.

Yang Y. and Klessig D. F. **1996**. Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus–inducible *myb* oncogene homolog from tobacco. *Proceedings of National Academy of Science*, USA, 93: 14972-14977.

Yeo A. R., Capon S. J. M., and Flowers T. J. **1985**. The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.): gas exchange by individual leaves in relation to their salt content. *Journal of Experimental Botany*, 36: 1240-1248.

Yokoi S., Quintero F. J., Cubero B., Ruiz M. T., Bressan R. A., Hasegawa P. M., Pardo J. M. **2002**. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response. *Plant Journal*, 30 (5): 529-539

Yoshida Y., Kiyosue T., Katagiri T., Ueda H., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Harada Y., Shinozaki K. **1995**. Correlation between the induction of a gene for delta l-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant Journal*, 7: 751-760.

Zeevaart J. A. D. and Creelman R. **1988**. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 439-473.

Zekri M. **1987**. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on the water relations, growth, and morphology of citrus rootstock seedlings. Ph.D. Dissertation, University of Florida , Gainesville, 132 pp.

Zekri M. **1993**. Salinity and calcium effects on emergence, growth and mineral composition of seedling of eight citrus rootstocks. *Journal of Horticultural Science*, 68 (1): 53-62.

Zekri M. and Parsons L. R. **1992**. Salinity tolerance of citrus rootstocks: effects of salt on root and leaf mineral concentrations. *Plant and Soil*, 147 (2): 171-181.

Zhao X.-P., Si Y., Hanson R. E., Crane C. F., Price H. J., Stelly D. M., Wendel J. F., and Paterson A. H. **1998**. Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploidy formation in cotton. *Genome Research*, 8: 479-492.

Zhang H. X. and Blumwald E. **2001**. Transgenic salt tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*, 19: 765-768.

Zhang H. X., Hodson J. N., Williams J. P., Blumwald E. **2001**. Engineering salt tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceedings of Natural Academy of Science*, USA, 98: 12832-12836.

Zhu J.-K. **2002**. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 247-273.

Zhu C., Schraut D., Hartung W., Schäffner A. R. **2005**. Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *Journal of Experimental Botany*, 56: 2971-2981.

Zhu B., Su J., Chang M., Verma D. P. S., Fan Y. L., Wu R. **1998**. Overexpression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. *Plant Science*, 199: 41-48.

ANNEXES

Composition des tampons

Tampon d'extraction d'ADN (TE1)

Tris 0.1M pH8

NaCl 1.4M

EDTA 0.05M

CTAB 2% (p/v)

PVP 1% (p/v)

Tampon TAE 1x

0.04M Tris-acétate

0.001M EDTA

Tampon de charge 1

0.25% bleu de bromophénol

0.25% xylène cyanol FF

30% glycérol

Tampon TNE 10x pH 7.4

Tris 100mM

EDTANa₂-2H₂O 10mM

NaCl 2M

Eau traitée au DEPC

DEPC 0.1%

Tampon d'extraction d'ARN (TE2) pH7.5

EDTA 1mM

Tris-HCl 10mM

NaCl 100mM

SDS 1%

Tampon de charge 2

Formaldéhyde 20%

Formamide 50%

20mM MOPS pH7

Glycérol 10%

EDTA 0.2mM

Bromure d'éthidium 2%

New universal mitochondrial PCR markers reveal maternal citrus phylogeny and give new information on citrus and lime origin.

Yann Froelicher^{1*}, Wafa Mouhaya¹, Jean-Baptiste Bassene¹, Gilles Costantino², Sajjad Hussein¹, Mourad Kamiri¹, Franck Curk², Francois Luro², Raphael Morillon¹ and Patrick Ollitrault³

1- Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Unité Propre de Recherche «Amélioration génétique d'espèces à multiplication végétative», San Giuliano, F-20230 France.

2- Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Unité de Recherche «Génétique et Ecophysiologie de la Qualité des Agrumes», San Giuliano, F-20230 France.

3- Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Unité Propre de Recherche «Amélioration génétique d'espèces à multiplication végétative», Montpellier, F-34398 France.

*Corresponding author: Yann Froelicher- Tel: +33(0)495595911. Fax: +33(0)495595937. E-mail : froelicher@cirad.fr

Running title : Mitochondrial PCR markers on citrus

Abstract

The aim of this work was to provide a set of mitochondrial markers in order to reveal polymorphism in citrus and to study the maternal phylogeny in citrus. We first used forty-four universal markers previously described in the literature: nine of those markers gave products of amplification but only one of them revealed polymorphism in citrus. We then designed six conserved pairs of primers using the complete mitochondrial DNA sequences of *Arabidopsis thaliana* and *Beta vulgaris* to amplify polymorphic intergenic and intronic regions. From these six pairs of primers, three defined in introns of genes coding for NADH dehydrogenase subunits 2, 5 and 7 revealed polymorphism in citrus. Primers defined in intergenic mitochondrial sequences did not reveal any polymorphism in citrus. We realized a phylogenetic study with four polymorphic primers on 77 genotypes representing the diversity of *Citrus* and two related genera. Seven haplotypes were identified. Six haplotypes (*Poncirus*, *Fortunella*, *C. micrantha*, *C. reticulata*, *Citrus medica* L. and *C. maxima*) were congruent with previous taxonomic investigations. The seventh haplotype allowed to distinguish an acidic/sour mandarin (Cleopatra, Sunki and Shekwasha) from mandarin and showed a maternal relationship with particular *C. limonia* and *C. jambhiri* (Rangpur, Volkameriana and Rough lemon). This haplotype contained only important species used as a rootstock. Our results suggest also that lime had two maternal origins, one from *C. micrantha* (Mexican, Giant Key, Tanepao, Coppenhad lime), one from *C. maxima* (Tahiti, Marrakech, Palestine Brazil sweet lime). Universality of those pairs of primers was tested in 18 genotypes belonging to the following dicotyledonous genera: *Psidium*, *Theobroma*, *Coffea*, *Hevea*, *Magnifera*, *Gossypium* and *Arabidopsis*. An interfamilial and intrageneric polymorphism was revealed showing the interest of these markers for phylogenetic studies.

Keywords : Citrus, dicotyledonous, diversity, mitochondria, PCR marker.

Introduction

Citrus taxonomy and phylogeny is often a subject of controversy because of high diversity of phenotypic characters, a long history of cultivation and a complex reproduction system. Indeed, the presence of self-incompatibility gene, facultative apomixis, gene of sterility and a large sexual compatibility between *Citrus* sp and related genera can be observed. The Asian origin of citrus is well established but the phylogeography through Asia remain uncertain. The main difficulty is the existence of a “primitive” form of a same *Citrus* sp in different localization like in the forests of Assam, India, (Hodgson, 1967) or in the Yunnan, China, (Gmitter and Hu, 1990), and/or surrounding areas like South China, Vietnam, Burma, and Thailand. Many classifications have been released but the Swingle and Reece (1967) and Tanaka (1977) classifications are the most used. Understanding taxonomy, phylogenetic relationships, and genetic variability in *Citrus* is critical for determining genetic relationships, characterizing germplasm, controlling genetic erosion, designing sampling strategies or core collections, establishing breeding programs, and the registration of new cultivars (Herrero et al., 1996). Barrett and Rhodes (1976) performed a numerical taxonomy on 43 genotypes and suggested that there were only three true species within the cultivated *Citrus*, citron (*C. medica* L.), mandarin (*C. reticulata* Blanco) and pummelo (*C. grandis* (L.) Osb). Other species were obtained from hybridization of this true species. Many biochemical and nuclear molecular markers have been developed to study the genetic diversity and the phylogeny of *Citrus* genera and related species including isozymes (Herrero et al., 1996; Torres et al., 1978), Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP (Federici et al., 1998) RAPD (Corazza-Nunes et al., 2002; Nicolosi et al., 2000; Nicolosi et al., 2005), ISSR (Fang et al., 1998; Gulsen and Roose, 2001), SSR (Corazza-Nunes et al., 2002). According to Federicci et al. (1998) and Nicolosi et al. (2000), *C. micrantha* was identified as a fourth true specie. This concept gained further support from various studies using cytoplasmic DNA markers (Nicolosi et al., 2000). Cytoplasm in *Citrus* is maternally inherited (Green et al., 1986; Yamamoto et al., 1993). Most of the studies were realized with chloroplastic marker. Using the cpSSR analysis, (Cheng et al., 2005) constructed molecular phylogeny of *Citrus*, but relationships of many species were not resolved. It has been shown a larger polymorphism within the chloroplast genomes when compared to the mitochondria genomes of the *Citrus* genus (Lotfy et al., 2003). The genetic role of mtDNA appears to be universally conserved but this genome exhibits remarkable variation in conformation and size (Gray et al., 1999). PCR marker showed a low level of discrimination when addressed to mtDNA regions (Engelke and

Tatlioglu, 2004), probably due to a slower nucleotide substitution rate in plant mtDNA (Muse, 2000).

The aim of this work was to provide a set of mitochondrial markers in order to reveal polymorphism in *Citrus* and two related species and to study the maternal phylogeny. We first tested forty-four PCR markers described by Dumolin-Lapegue et al. (1997) and Duminil et al. (2002). Then, after completing an analysis of the sequences available in the databases, we focused on the less conserved regions of the mitochondrial genomes to design primer pairs flanking these sequences. The aim was to obtain more polymorphic markers able to characterize citrus mitochondria. Intergenic sequences of *nad3-rps12*, *rpl5-cob* clusters, and intronic regions of *nad2*, *nad5* and *nad7* genes were targeted to design primer pairs. Finally, the universality of the designed primers was checked within 7 genera belonging to the dicotyledonous group.

Materials and methods

Plant material

Seventy two accessions belonging to *Citrus* and five to related species were sampled for mtDNA study (Table 1). Most of the plant materials were provided by germplasm collection of agronomic research station of Inra and Cirad in San Giuliano (Corse). New designed primers were tested on *Psidium guajava* L., *Theobroma cacao* L., *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., *Mangifera indica* L., *Gossypium barbadense* L., *Murraya paniculata* (L.)* Jack to assess their universality and on *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. as a control. Total DNA was extracted from fresh leaves according to Doyle and Doyle (1987).

Design of mitochondrial primers

Using the complete mitochondrial DNA genomes of *Arabidopsis thaliana* (NC_001284) and *Beta vulgaris* (NC_002511), alignments of conserved sequences were performed. Sequences of genes involved in the respiratory chain (*nad* and *cob*) and genes encoding for ribosomal proteins (*rpl* and *rps*) belonging to the *Arabidopsis thaliana* genome were selected. Sequences were aligned with those of *Beta vulgaris* using the software BIOEDIT[®]. Six primer pairs were then designed either in the consensus coding regions flanking intronic and intergenic sites or in the consensus sections within the non coding regions. Position and length of the primers were selected using Primer3[®] software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Position of primers on *Arabidopsis thaliana* or *Beta vulgaris* genomes and the expected size of each amplification product are shown in table 2. It is worth to note that primers were designed in conserved regions either within coding or non coding

regions in order to amplify the most polymorphic and shorter fragments as possible. Intergenic sequences of *rpl5-cob* and *nad3-rps12* and intronic regions of *nad7*, *nad5* and *nad2* genes were target regions to design new primer pairs in the *Arabidopsis thaliana* and *Beta vulgaris* sequences.

6.1. PCR amplification

MtDNA amplification using 44 pairs of primers previously described by Dumolin-Lapegue et al. (1997) and by Duminil et al. (2002) and the six newly developed primers were performed using Primus 96 plus MWG Biotech thermal cycler. The PCR reaction (15 µL final volume containing 0.8U of Taq DNA polymerase (Eurogentec), 10 ng of total DNA, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% (v/v) Tween 20, 0.2 µM reverse primer and 0.2 µM forward primer) was performed as follows : initial denaturation of 94°C for 5min, then 40 amplification cycles of : 30s of denaturation at 94°C, 1 min at the annealing temperature (Table 2) and 1min 30s of extension at 72°C, followed by a final DNA elongation at 72°C for 4min.

DNA analysis

Primer specificity and PCR product size were assessed on 1% agarose gel. PCR products sized less than 500 bp were separated by electrophoresis in denaturing 5% polyacrylamid gel (Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, 40% (w/v)), 7M urea) at 60 W constant power. Electrophoresis was performed at 12 W constant power (Liu et al., 2000) in 5% native polyacrylamid gel (Acrylamid/Bisacrylamid (29:1, 40% (w/v))) for fragments ranging from 600 bp to 1 kb, and in 4% native polyacrylamid gel for fragments ranging from 1 to 2 kb. Gels migrated in 0.5X TBE buffer. Denaturing gels were run for 2h and native gels for 6 to 7h. The buffer of migration was changed after 4h of running in the upper and lower compartments of the electrophoresis setup according to Liu et al. (2000). Revelation of gels was performed by silver staining according to Beidler et al. (1982).

6.2. Phylogenetic analysis

Polymorphisms of length variations were scored as present or absent. A similarity matrix based on Dice's coefficient (1945) was produced using DARwin version 5.0.155 (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006). Tree was constructed in DARwin version 5.0.155 using an unweighted neighbor joining (500 bootstrap replicates) from the genetic distance matrix generated.

Results

Selection of polymorphic primers

Thirty-five mitochondrial primer pairs published by Duminil et al. (2002) and nine by Dumolin-Lapegue et al. (1997) were tested for PCR amplification in citrus. Nine pairs of primers (*atp6-2*; *atp9*; *cox1*; *nad4/2-3*; *rpl5*; *rps3*; *rps4*; *nad7/4-5* and *rrn5/rrn18-1*) gave an amplification product but only one (*rrn5/rrn18-1*) revealed polymorphism in citrus. In order to provide more polymorphic mitochondrial markers in citrus, six pairs of primers were designed using the *Arabidopsis thaliana* and *Beta vulgaris* mitochondrial genomes as references. Among the six primer designed, three couples of primers amplifying intronic regions (*nad2/4-3*, *nad5/2-1*, *nad7/1-2*) did success to amplify all plant DNA and showed polymorphism. However, the *nad3/rps12* and *nad2/5-4* primers amplified one fragment but did not success in revealing any polymorphism among citrus. Only primers defined in intergenic sequences of *rpl5-cob* revealed a multilocus profile.

Polymorphism observed with mitochondrial PCR marker

Four mitochondrial PCR markers (*nad2/4-3*, *nad5/2-1*, *nad7/1-2* and *rrn5/rrn18-1*) showed some degree of polymorphism among the analyzed *Citrus* accessions. The number of alleles varied from 2 to 3 on 77 genotypes (Table 3). The PIC values among the four loci mt PCR markers varied from 0.05 (*nad5/2-1*) to 0.63 (*nad2/4-3*) (Table 3).

The *nad5/2-1* allowed to characterize specifically the *Poncirus trifoliata* (trifoliolate orange), one of the three genera with *Citrus* and *Fortunella*. The *rrn5/rrn18-1* allowed discriminating 2 haplotypes (*C. maxima*, *C. medica* and *C. micrantha*), (*C. reticulata*, *C. sunki*, *P. trifoliata* and *F. japonica*). The *nad2/4-3* markers allowed to characterize 3 haplotypes (*C. reticulata*, *F. japonica*), (*C. medica*, *P. trifoliata*), (*C. maxima*). The *nad7/1-2* allowed to characterize 3 haplotypes (*C. reticulata*, *C. maxima*), (*C. medica*, *F. japonica*) and *P. trifoliata*.

Citrus phylogenic analysis

Based on the four polymorphic mitochondrial PCR markers (*nad2/4-3*, *nad5/2-1*, *nad7/1-2* and *rrn5/rrn18-1*), a tree representation (Fig. 1) of genetic similarities between pairs of genotype based on Dice coefficient (Dice, 1945) were constructed using the Neighbour Joining clustering method (Saitou and Nei, 1987). Seven haplotypes were observed:

- 1) Pummelo haplotype: This haplotype contained the most important commercial varieties like *C. maxima*, *C. paradisi*, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. limon* (tanaka classification), *C. pseudolimon*, *C. limetta*, *C. latifolia*, *C. limettioides* and *C. latipes*;
- 2) Micrantha haplotype: *C. micrantha*, *C. hystrix*, *C. aurantifolia*, *C. junos*, *C. halimi*, *C. macrophylla* and *C. excelsa* ;
- 3) Citron haplotype contained only *C. medica*;

- 4) Mandarin haplotype contained nearly all the mandarin accessions excepted Bendi guandju, *C. sunki*, *C. reshni* and *C. depressa*;
- 5) Poncirus haplotype contained only *P. trifoliata*;
- 6) “Acid rootstock” haplotype contained three particular mandarin (*C. sunki*, *C. reshni* and *C. depressa*) and *C. limonia* and *C. jambhiri*, all used as rootstock ;
- 7) Fortunella haplotype contained only *Fortunella* sp.

The different species of lime belong to two different haplotype. *C. limetta*, *C. latifolia*, *C. limettioides* belong to the *C. maxima* haplotype whereas *C. aurantifolia* belong to the *C. micrantha* haplotype. So, the large fruit lime belong to the same haplotype than the pummelo and the small fruit lime belong to the same haplotype than the micrantha.

Universality of the primers

Universality of all the new pairs of defined primers was tested in 24 genotypes belonging to the following dicotyledonous genera: *Psidium*, *Theobroma*, *Coffea*, *Hevea*, *Magnifera*, *Gossypium*, *Citrus*, *Poncirus*, *Murraya* and *Arabidopsis*. Among the six pairs of primer, five PCR primers (*nad2/4-3*, *nad2/5-4*, *nad5/2-1*, *nad7/1-2* and *nad3/rps12*) gave an amplification product and revealed polymorphism (Fig. 2). Using *nad2/4-3* primer pair, an interspecific polymorphism was as well revealed into the mango group while *Psidium guajava* and *Hevea brasiliensis* amplified two fragments as shown on figure 2. *nad2/5-4* and *nad5/2-1* primer pairs showed an interfamilial polymorphism (Fig. 2). *nad7/1-2* revealed inter genera polymorphism (Fig. 2).

To end, in order to have a more detailed drawing of the interest of the generated primers, sizes of PCR products obtained with the six newly developed primer pairs are presented in Table 2.

Discussion

Mitochondrial marker diversity in citrus and relatives.

In order to get mtDNA markers displaying diversity in citrus, several primers pairs previously defined were tested (Duminil et al., 2002; Dumolin-Lapegue et al., 1997). Only one (*rrn5/rrn18-1*) revealed polymorphism (Fig. 1). It can be noted that Lotfy et al. (2003) did not find any polymorphism in *Citrus* species with primers developed by Demesure et al. (1995) even after developing CAPS. Tree of our new markers allowed to reveal polymorphism in *Citrus*. However, by combination of the data obtained using the *nad2/4-3*, *nad7/1-2*, *rrn5/rrn18-1* and *nad5/1-2* markers, it is possible to differentiate the seven haplotypes in *Citrus* sp., *Fortunella* sp. and the *Poncirus trifoliata*.

This new set of mitochondrial primer allowed analyzing the maternal heredity in true citrus.

One haplotype characterize *Fortunella* sp and one characterize *Poncirus trifoliata*. It is worth to note that these genera never transmitted naturally their maternal cytoplasm to other citrus hybrid. In the five haplotypes observed in the *Citrus* sp, four correspond to the cluster *C. medica*, *C. maxima*, *C. reticulata* and *C. micrantha* described previously by Nicolosi *et al.* (2000) and Abkenar *et al.* (2004; 2008). A new particular haplotype appears in our study which contained six genotypes (*C. reshni* “Cleopatra”, *C. sunki* “Sunki”, and *C. depressa* “Shekwasha”, *C. limonia* “Volkameriana” and “Rangpur” and *C. jambhiri* “Rough lemon). “Cleopatra”, “Sunki”, and “Shekwasha” are three particular mandarins classified as *C. reticulata* by Swingle and Reece (1967) but Tanaka (1977) distinguished these 3 genotypes from the other mandarin named *C. reshni*, *C. sunki* and *C. depressa*, respectively. However, nuclear marker (SSR, ISSR, RAPD) didn’t display any difference between this “Cleopatra” and the mandarins group (Barkley *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000). “Rangpur” lime and “Rough” lemon belonged to the same haplotype. Ollitrault *et al.* (2003) showed using allozyme that “Rangpur”, “Rough” lemon and Volkameriana clustered with the group of limes. Scora (1975) suggested that “Rough” lemon was a natural hybrid of a mandarin and a citron. Based on RAPD, SCAR and ISSR, Nicolosi *et al.* (2000) and Barkley *et al.* (2006) proposed that citron and mandarin are both ancestors of “Rough” lemon and “Rangpur”, but can not be considered to be direct parents. Gulsen and Roose (2001) observed that cpDNA patterns clustered “Rangpur lime” with “Sunki” mandarin but “Cleopatra” and “Shekwasha” were not part of the study. Our data suggest that these specific mandarins could be the female parent of “Rangpur” and “Rough” lemon. Volkameria lemon is more complex. In a previous work, Deng *et al.* (1996) found that Volkameria could be a hybrid of citron and sour orange. Nicolosi *et al.* (2000) confirmed this assumption that was probably gained by backcrossing with mandarin. Barkley *et al.* (2006) found that structure analysis showed admixture between the citron, mandarin and pummelo groups with the majority of its alleles coming from the citron and mandarin group. The center of origin of this fruit is still controversial topic. Hodgson (1967) considered Cleopatra, Vokameriana, Rough lemon and Rangur to be native from northeastern India but Gmitter and Hu (1990) considered “Sunki”, “Rough lemon” and “Rangur” to be native from the Yunnan. It is worth to note that all of those genotypes are used like rootstock because of their tolerance to many biotic and abiotic stresses (Ollitrault *et al.*, 2003). One may consider this result as an important information since the mt genome origins is usually not taken in account in citrus rootstock breeding programs. Then, it is required to study the exact role of the cytoplasmic genomes in those tolerances.

The citron haplotype contains only *C. medica*. This specie did not transmit its cytoplasm to other species but plays an import role as a male parent. Nicolosi *et al.* (2000) displayed with nuclear and cytoplasmic marker that citron was the male parent of lemon, “Mexican” lime, “Volkamerina”, “Rangpur”, “Rough” lemon, “Bergamote”, “Palestine” lime.

The mandarin haplotype contained nearly all the mandarin accessions excepted “Nasnaran”, “Cleopatra”, “Sunki”, “Pectinifera” and “Ben Di Guang Ju”. Mandarin played an important role in the evolution. Phylogenetic analysis by Scora (1975) and Barrett and Rhodes (1976) suggested that mandarin was one ancestral parent of sweet orange, sour orange. Molecular markers supported this hypothesis that mandarin was the parent from different species derived from hybridization (Barkley *et al.*, 2006; Federici *et al.*, 1998; Herrero *et al.*, 1996; Nicolosi *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 1978).

The micrantha haplotype contained many different species (*C. micrantha*, *C. hystrix*, *C. ichangensis*, *C. halimii*, *C. macrophylla*, *C. junos*, *C. exelsa*, *C. amblycarpa* and *C. aurantifolia* (Mexican, Tanepao, Coppenrhad, Gallet, Giant Key)). All of these genotypes are acidic. *C. micrantha* was considered to be the possible ancestor of the other genotypes which possessed the highest number of unique RAPD, SCAR and cpDNA markers (Nicolosi *et al.*, 2000). *C. micrantha*, considered as monembryonic could be the female parent of many genotypes (The Citrus Industry, Vol 1, pp 393-394). According to Nicolosi *et al.* (2000), *C. hystrix* and *C. aurantifolia* belong to the micrantha haplotype. The taxonomy origin of *C. junos* ‘Yuzu’ is still controversial. Swingle (1967) suspected that ‘Yuzu’ was a hybrid between Ichang Papeda and mandarin; while Tanaka (1954) described ‘Yuzu’ as specie that it is not a hybrid. As well, Hirai *et al.* (1986) reported that ‘Yuzu’ was not a hybrid between Ichang Papeda and mandarin by isozyme analysis. Our result displayed that “Yuzu” had the same maternal origin than *C. ichangensis* and *C. micrantha* suggesting that Yuzu had a papeda maternal origin.

The pummelo haplotype contained the most important species in cultivated citrus. It confirms that *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. paradisi*, *C. lemon* (tanaka classification), *C. latipes* had pummelo maternal origin (Green *et al.*, 1986; Nicolosi *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 1993). Bendi guangju mandarin (*C. nobilis* Tanaka classification) was considerate to be closely related to Satsuma mandarin. According to Cheng *et al.* (2005), Bendiguangju presented a pummelo haplotype and not a mandarin haplotype. In our study, King of Siam (*C. nobilis* Tanaka classification) holds a mandarin haplotype. So, this two *C. nobilis* present different cytoplasmic origin and should not be classified as the same species. Chinotto (*C. myrtifolia*

Tanaka classification), which displayed the pummelo haplotype is considerate to be closely from *C. aurantium* (Barkley et al., 2006).

The maternal phylogeny of lime

The origin of lime is multiple and complex. Our result suggests that limes belong to two different haplotype. *C. limetta*, *C. latifolia*, *C. limettioides* belong to the *C. maxima* haplotype whereas *C. aurantifolia* belong to the *C. micrantha* haplotype. The two most important commercial varieties of limes are the “Mexican” lime and “Tahiti” lime. Mexican limes are apparent hybrids of citrons and papedas (Nicolosi et al., 2000; Scora, 1975). According Nicolosi et al. (2000), “Mexican” lime has micrantha maternal origin. Gulsen and Roose (2001) clustered Mexican lime in mandarin group probably because of the absence of micrantha.

The origin of the “Tahiti” lime is unknown. Groff (1927) and Morton (1987) suggested that “Tahiti” lime is presumed to be a hybrid of the “Mexican” lime and citron, or, less likely, the lemon. Our result suggests for the first time that “Mexican” lime and “Tahiti” lime have not the same maternal origin. Hodgson (1967) observed that the Tahiti lime and the Sweet lime bear slight resemblances to the galgal and the Tunisian limetta. The limes include both acid and sweet varieties, but for Hodgson (1967) the limes consist of two kinds, the small-fruited Mexican lime and the large-fruited Tahiti or Persian lime. These two kinds of limes correspond to the two different haplotypes observed.

Universality and diversity of new designed primers

Over the six pairs of primers we generated, five gave PCR amplification and revealed polymorphism among several tropical plants tested (Fig. 2).

In these plants genera, the level of polymorphism appeared to be lower than in the citrus group. For instance, no interspecific diversity was observed between the two *Arabidopsis* ecotypes or between the *Coffea* and *Gossypium* ones. Only one loci (*nad2/4-3*) among five were polymorphic between *Mangifera* species as well as between *Psidium* species.

In conclusion, the new mtDNA markers proposed in this study will be very useful and very efficient for determining the maternal origin of citrus species. Seven haplotypes were identified. Six haplotypes (*Poncirus*, *Fortunella*, *C. micrantha*, *C. reticulata*, *Citrus medica* L. and *C. maxima*) were congruent with previous taxonomic investigations and the seventh haplotypes allowed to distinguish an acidic/sour mandarin (Cleopatra, Sunki and Shekwasha) from mandarin and showed a maternal relationship with particular *C. limonia* and *C.*

jambhiri (Rangpur, Volkameriana and Rough lemon). Our results suggest also that lime had two maternal origins, one from *C. micrantha* (Mexican, Giant Key, Tanepao, Coppenhad lime), one from *C. maxima* (Tahiti, Marrakech, Palestine Brazil sweet lime).

Acknowledgments

We thank the “Comité Mixte Inter Universitaire Franco-Marocain” (Programme Volubils, MA/05/137) and the “Collectivité Territoriale de Corse” for the grant assigned to Wafa Mouhaya and to Jean-Baptiste Bassene, respectively. This study was funded by the “Collectivité Territoriale de Corse” (CTC), the Interreg IIIA program.

References

- Abkenar, A.A., Isshiki, S., Tashiro, Y., 2004. Phylogenetic relationships in the "true citrus fruit trees" revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. *Scientia Horticulturae* 102, 233-242.
- Abkenar, A., Isshiki, S., Matsumoto, R., Tashiro, Y., 2008. Comparative analysis of organelle DNAs in acid citrus grown in Japan using PCR-RFLP method. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55, 487-492.
- Barkley, N., Roose, M., Krueger, R., Federici, C., 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 112, 1519-1531.
- Barrett, H.C., Rhodes, A.M., 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Systematic Botany* 1, 105-136.
- Cheng, Y., Vicente, Beidler J. L., Hilliard P., Rill R. L. 1982. Ultrasensitive Staining of Nucleic Acids with Silver. *Analytical Biochemistry*, 126 (2): 374-380.
- M.C.d., Meng, H., Guo, W., Tao, N., Deng, X., 2005. A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in Citrus and related genera. *Tree Physiology* 25, 661-672.
- Corazza-Nunes, M.J., Machado, M.A., Nunes, W.M.C., Cristofani, M., Targon, M.L.P.N., 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica* 126, 169-176.
- Deng, X., Yi, H., Guo, W., Grosser, J.W., Gmitter, F.G., Jr., 1996. Pollen fertility of citrus somatic hybrids and its genetic stability. *Journal of Fruit Science* 13, 141-144.
- Dice, L.R., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26, 297-302.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.

- Duminil, J., Pemonge, M.H., Petit, R.J., 2002. A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes* 2, 428-430.
- Dumolin-Lapegue, S., Pemonge, M.H., Petit, R.J., 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology* 6, 393-397.
- Engelke, T., Tatlioglu, T., 2004. The fertility restorer genes X and T alter the transcripts of a novel mitochondrial gene implicated in CMS1 in chives (*Allium schoenoprasum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 271, 150-160.
- Fang, D., Krueger, R.R., Roose, M.L., 1998. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123, 612-617.
- Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W., Roose, M.L., 1998. Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 96, 812-822.
- Gmitter, F.G., Jr., Hu, X.L., 1990. The possible role of Yunnan China in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae). *Economic Botany* 44, 267-277.
- Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F., 1999. Mitochondrial Evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Green, R.M., Vardi, A., Galun, E., 1986. The plastome of Citrus. Physical map, variation among Citrus cultivars and species and comparison with related genera. *Theoretical and Applied Genetics* 72, 170-177.
- Groff, G.W. 1927. Culture and varieties of Siamese pummelos as related to introductions into other countries. *Lingnan Sci. Jour.* 5:187-254.
- Gulsen, O., Roose, M.L., 2001. Lemons: diversity and relationships with selected Citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126, 309-317.
- Herrero, R., Asins, M.J., Pina, J.A., Carbonell, E.A., Navarro, L., 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae. II. Genetic relationships among genera and species. *Theoretical and Applied Genetics* 93, 1327-1334.
- Hirai, M., Kozaki, I., Kajiura, I., 1986. Isozyme analysis and phylogenic relationship of Citrus. *Japanese Journal of Breeding* 36, 377-389.
- Hodgson, R.W., 1967. Horticultural varieties of Citrus. In: Reuther, W., Webber, H.J., D., B.L. (Eds.), *The Citrus Industry*. University of California, Riverside, pp. 431-589.
- Liu, Q., Scaringe, W.A., Sommer, S.S., 2000. Discrete mobility of single-stranded DNA in non-denaturing gel electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* 28, 940-943.

- Lotfy, S., Luro, F., Carreel, F., Froelicher, Y., Rist, D., Ollitrault, P., 2003. Application of cleaved amplified polymorphic sequence method for analysis of cytoplasmic genome among Aurantioideae intergeneric somatic hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128, 225-230.
- Morton, J. 1987. Tahiti Lime. In: *Fruits of warm climates*. Julia F. Morton, Miami, FL. p. 172–175.
- Muse, S.V., 2000. Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. *Plant Molecular Biology* 42, 25-43.
- Nicolosi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., Malfa, S.I., Continella, G., Tribulato, E., 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100, 1155-1166.
- Nicolosi, E., Malfa, S.I., El-Otmani, M., Negbi, M., Goldschmidt, E.E., 2005. The search for the authentic citron (*Citrus medica* L.): historic and genetic analysis. *HortScience* 40, 1963-1968.
- Ollitrault, P., Jacquemond, C., Dubois, C., Luro, F., 2003. Citrus. In: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J. (Eds.), *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. Science publishers and Cirad, Paris, pp. 193-217.
- Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P., 2006. DARwin software. In: <http://darwin.cirad.fr/darwin> (Ed.).
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-joining method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Scora, R.W., 1975. On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102, 369-375.
- Swingle, W.T., Reece, P.C., 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In: Reuther, W., Webber, H.J., D., B.L. (Eds.), *The Citrus Industry*. University of California, USA, Riverside, pp. 190-430.
- Tanaka, T., 1954. *Species Problem in Citrus*. Japanese Society for the Promotion of Science, Tokyo.
- Tanaka, T., 1977. Fundamental discussion of Citrus classification. *Stud. Citrologia* 14, 1-6.
- Torres, A.M., Soost, R.K., Diederhoben, U., 1978. Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. *American Journal of Botany* 65, 869-881.
- Yamamoto, M., Kobayashi, S., Nakamura, Y., Yamada, Y., 1993. Phylogenic relationships of citrus revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. *Japanese Journal of Breeding* 43, 355-365.

Table 1 : Genotypes studied for mtDNA phylogenic analysis. * coming from the germplasm bank of the University of Agriculture, Faisalabad (Pakistan). **coming from the germplasm bank of the University of Cukurova, Adana (Turkey).

SRA n°	Swingle system	Tanaka system	Commun name
140	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Mexican lime
697	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. limettioïdes</i> Tanaka	Brazil Sweet
779	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. macrophylla</i> Wester	Macrophylla or Alemow
0110234	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. excelsa</i> Wester	Excelsa
802	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. limettioïdes</i> Tanaka	Palestine sweet lime
838	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Coppenrhad lime
836	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Tanepao lime
58	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. latifolia</i> (Yu Tanaka) Tanaka	Tahiti lime
616	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. latifolia</i> (Yu Tanaka) Tanaka	Bears lime
1057	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Gallet
785	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.	Giant Key lime
612		<i>C. bergamia</i> Risso and Poit.	Bergamote orange
952	<i>C. aurantium</i> L.	<i>C. aurantium</i> L.	Maroc sour orange
122	<i>C. aurantium</i> L.	<i>C. aurantium</i> L.	Bouquettier de Nice sour orange
870	<i>C. aurantium</i> L.	<i>C. aurantium</i> L.	Granito sour orange
*	<i>C. aurantium</i> L.	<i>C. myrtifolia</i> Raf.	Chinotto

0110302	<i>C. halimii</i> B.C. Stone (Tanaka Class.)	<i>C. halimii</i> B.C. Stone	Mountain
630	<i>C. hystrix</i> D.C.	<i>C. hystrix</i> D.C.	Combava
846	<i>C. ichang austera</i> ex. Tanaka hybrid	<i>C. junos</i> Siebold	Yuzu
686	<i>C. ichangensis</i> Swingle	<i>C. ichangensis</i> Swingle	Ichang
818		<i>C. latipes</i> (Swingle)	
	<i>C. latipes</i> (Swingle) Tanaka	Tanaka	Khazi
*	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. pseudolimon</i> Tanaka	Galgai
944	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limonia</i> Osbeck	Rangpur lime
16	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	Lisbon lemon
2	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	Eureka lemon
292	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	Meyer lemon
778	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. jambhiri</i> Lush.	Rough Lemon
729	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limonia</i> Osbeck	Volkameriana
829	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limetta</i> Risso	Marrakech lime
*	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	<i>C. limonia</i> Osbeck	Rangpur nepal
710	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Sans Pépin pummelo
322	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Pink pummelo
608	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Chandler pummelo
613	<i>C. medica</i> L.	<i>C. medica</i> L.	Corsican citron
709	<i>C. medica</i> L.	<i>C. medica</i> L.	Etrog citron
640	<i>C. medica</i> L.	<i>C. medica</i> L.	Digité citron
**	<i>C. micrantha</i> Wester	<i>C. micrantha</i> Wester	Micrantha
*	<i>C. paradisi</i> Macf.	<i>C. natsudaiadai</i> Hayata	natsudaidai
293	<i>C. paradisi</i> Macf.	<i>C. paradisi</i> Macf.	Star Ruby grapefruit
470	<i>C. paradisi</i> Macf.	<i>C. paradisi</i> Macf.	Duncan grapefruit
284	<i>C. paradisi</i> Macf.	<i>C. paradisi</i> Macf.	Marsh grapefruit
133	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. deliciosa</i> Ten.	Willow Leaf mandarin
443	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. unshiu</i> Marc.	Miho Satsuma
584	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. reticulata</i> Blanco	Ponkan mandarin
261	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. reticulata</i> Blanco	Beauty mandarin
583	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. nobilis</i> Lour.	King of Siam mandarin

705		<i>C. sunki</i> (Hayata) hort. ex Tanaka.	Sunki mandarin
	<i>C. reticulata</i> Blanco		
652	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. reticulata</i> Blanco	Ananas mandarin
552	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan.	Dancy mandarin
445	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. unshiu</i> Marc.	Okitsu Satsuma
500	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. unshiu</i> Marc.	Closellina Satsuma
578	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. nobilis</i> Lour.	Bendi Guangju
230	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. unshiu</i> Marc.	Wase Satsuma
221	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. unshiu</i> Marc.	Owari Satsuma
657	<i>C. reticulata</i> Blanco	<i>C. unshiu</i> Marc.	Pucheng Satsuma
309		<i>C. temple</i> hort. ex Yu	
	<i>C. reticulata</i> Blanco	Tanaka	Temple mandarin
982			Pectinifera or
	<i>C. reticulata</i> Blanco hybrid	<i>C. depressa</i> Hayata	Shekwasha
896		<i>C. amblycarpa</i> (Hassk.)	
	<i>C. reticulata</i> Blanco hybrid	Ochse.	Nasnaran mandarin
948	<i>C. reticulata</i> var <i>austera</i>	<i>C. reshni</i> Hort. ex Tan.	Cléopatra mandarin
92		<i>C. clementina</i> hort.ex	
	<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>	Tanaka	Commun Clémentine
601	<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>	Murcott tangor
692	<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>	Ellendale tangor
0110162	<i>C. reticulata</i> x <i>P. trifoliata</i>	<i>C. reticulata</i> x <i>P. trifoliata</i>	Citrandarín B47
31	(<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>) x <i>C. tangerina</i>	(<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>) x <i>C. tangerina</i>	Fortune mandarin
524	<i>C. reticulata</i> Blanco hybrid	<i>C. tankan</i> Hayata	Tankan Hayata
246	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Valencia Late orange
217		<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Washington Navel orange
	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck		
544	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Tarocco orange
299	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Shamouti orange
41	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Hamlin orange
599	<i>C. tachibana</i> Swingle	<i>C. erythroa</i> hort. ex Tanaka	Fuzhu mandarin

769	<i>C. tachibana</i> Swingle	<i>C. erythrosa hort. ex Tanaka</i>	San Hu Hong Chu mandarin
839	<i>C. tachibana</i> Swingle	<i>C. kinokuni hort. ex Tanaka</i>	Nan Feng Mi Chu mandarin
482	<i>Fortunella japonica</i> (Thumb.) Swingle	<i>Fortunella japonica</i> (Thumb.) Swingle	Marumi Kumquat
711	<i>F. crassifolia</i> Swingle	<i>F. crassifolia</i> Swingle	Meiwa Kumquat
492		<i>F. margarita</i> (Lour.) Swingle	
	<i>F. margarita</i> (Lour.) Swingle	Swingle	Nagami Kumquat
1074		<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raph	Pomeroy Trifoliate orange
	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raph	Raph	

Table 2. Amplification results of 9 pairs of mitochondrial primers previously described tested on citrus and related species and 6 new pairs of mitochondrial primers tested on citrus and dicotyledonous species.

Name	Source	Reverse primer	Sequence (5'-3')	Forward primer	Sequence (5'-3')	Position ^a / DNA origin	Amplification test ^b	Expected size (pb)	T _m (°C)
<i>atp6-2</i>	Duminil et al. (2002)	<i>atp6</i>	gcatcattcaagtaaataca	<i>atp2</i>	gtgaagctgtctggaggg	96836-98081 / <i>A. thaliana</i>	DSBEFI	1264	50
<i>atp9</i>	Duminil et al. (2002)	<i>atp9</i>	ccaagtgagatgtccaagat	<i>atp9</i>	cttcggtagagcaaagcc	78821-79081 / <i>A. thaliana</i>	DSBEFI	279	50
<i>cox1</i>	Duminil et al. (2002)	<i>cox1</i>	ttgttacgaccacgaaga	<i>cox1</i>	tcgggtgccattgtggag	149988-151329 / <i>A. thaliana</i>	DSBEFI	1360	58
<i>nad4/2-3</i>	Duminil et al. (2002)	<i>nad4/2</i>	ctcctcagtagcccatatga	<i>nad4/3</i>	aaccagtcctgacttaaca	164093-167257 / <i>A. thaliana</i>	DSBEFI	3184	55
<i>nad7/4-5</i>	Duminil et al. (2002)	<i>nad7/4</i>	tgtcctccatcacgatvtcg	<i>nad7/5</i>	ccaaattctccttaggtgc	136033-137965 / <i>A. thaliana</i>	DSBEFI	1952	58
<i>rpl5</i>	Duminil et al. (2002)	<i>rpl5</i>	agtggtaaagtctcatct	<i>rpl5</i>	atygtgtgaaataagagtag	58256-57842 / <i>A. thaliana</i>	DSBEFI	432	50
<i>rps3</i>	Duminil et al. (2002)	<i>rps3</i>	ggcgtatttcggatgctt	<i>rps3</i>	tcaagtygggtcagtgag	26598-28658 / <i>A. thaliana</i>	DSBEFI	2076	50
<i>rps4</i>	Duminil et al. (2002)	<i>rps4</i>	csttcygtccgaagag	<i>rps4</i>	tctccgaagattgagg	82048-82979 / <i>A. thaliana</i>	DSBEFI	950	58
<i>rrn5/rrn18-1</i>	Duminil et al. (2002)	<i>rrn5</i>	gaggtcggaatgggatcggg	<i>rrn18/1</i>	gggtgaagtcgtaacaaggt	161129-161383 / <i>A. thaliana</i>	DSBEFI	273	50
<i>rpl5/cob</i>	Designed	<i>rpl5</i>	ccaacacacaagatgaga	<i>cob</i>	agaacatacttgcccc	58262-60094 / <i>A. thaliana</i>	PtCHMGADSBEFI	1832	55
<i>nad5/2-1</i>	Designed	<i>nad5/2</i>	ctggtagatgcgtgg	<i>nad5/1</i>	acacggctcaccaac	142368-142643 / <i>A. thaliana</i>	PTCHMGADSBEFI	275	50
<i>nad2/4-3</i>	Designed	<i>nad2/4</i>	cccttcctttctgttgt	<i>nad2/3</i>	tagtggtcgatatagggg	330666-331566 / <i>A. thaliana</i>	pTChMGADSBEFI	900	50
<i>nad2/5-4</i>	Designed	<i>nad2/5</i>	tcatatagaatccatgtcct	<i>nad2/4</i>	tatttcggctattaccttc	328014-329873 / <i>A. thaliana</i>	PTCHMGADSBEFI	1859	50
<i>nad3/rps12</i>	Designed	<i>nad3</i>	tgaatggaaaagggg	<i>rps12</i>	ccgtactttggctatctt	263581-263831 / <i>B. vulgaris</i>	PTCHMGADSBEFI	250	50
<i>nad7/1-2</i>	Designed	<i>nad7/1</i>	tttgatataggtcgct	<i>nad7/2</i>	ggaacatagcataggg	132914-133077 / <i>A. thaliana</i>	PTChMGADSBEFI	163	50

^a, Position of the 5'-end of each primer on the mitochondrial genome ; ^b, P, *Psidium* ; T, *Theobroma* ; C, *Coffea* ; H, *Hevea* ; M, *Mangifera* ; G, *Gossypium* ; A, *Arabidopsis thaliana* ; D, *Citrus reticulata* ; S, *C. maxima* ; B, *C. medica* ; E, *Poncirus trifoliata* ; F, *Fortunella japonica* ; I, *Murraya paniculata*. Capital letters are used when amplification did success, lower-case letters when no amplification occurred and italics when several fragments are amplified.

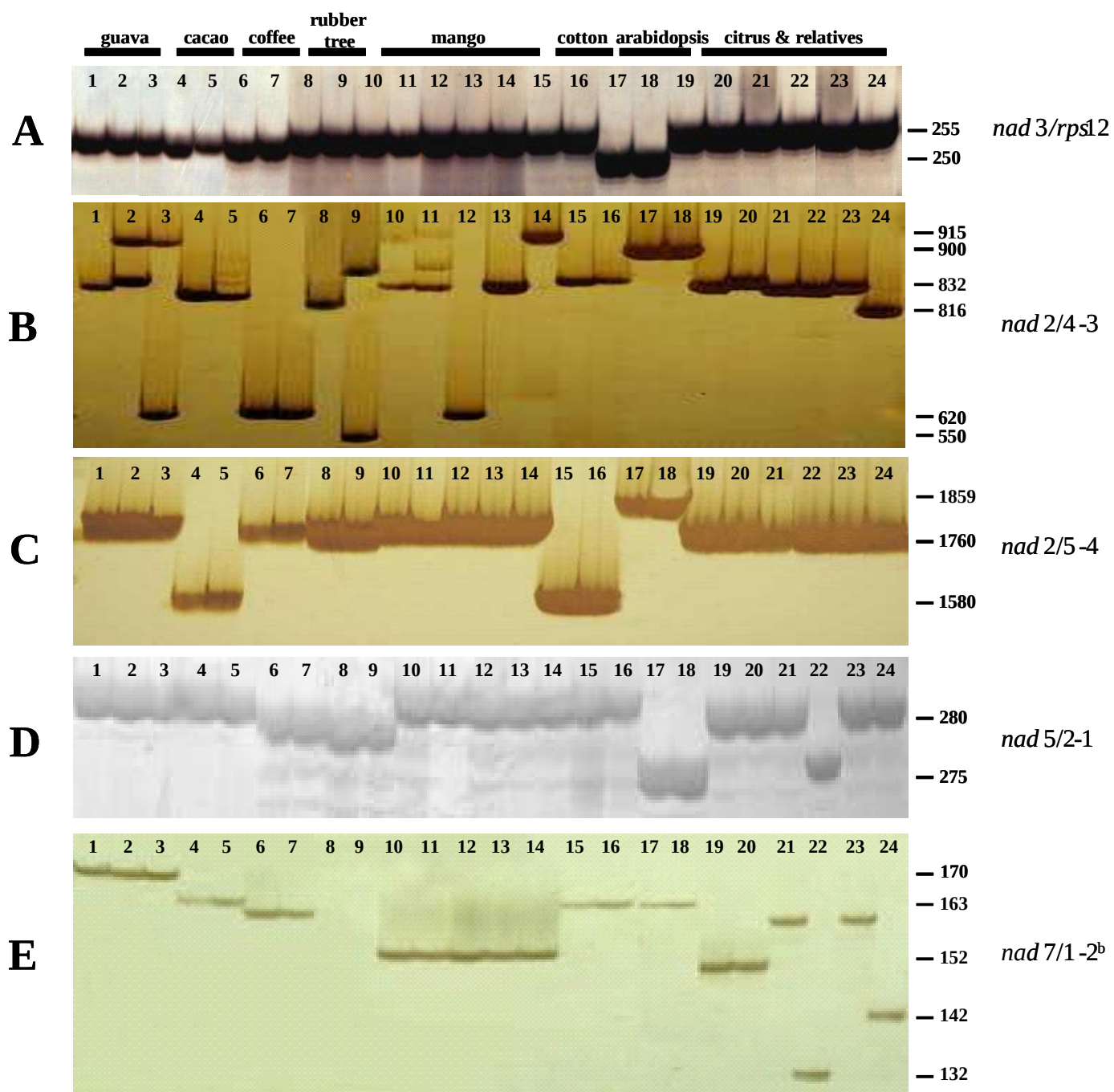
Table 3: Number of allele, size range and polymorphism information content (PIC) value per locus obtained on 77 individuals belong to true Citrus.

locus	Number of alleles	Size range (bp)	PIC
<i>rrn5/rrn18-1</i>	2	260-256	0.49
<i>nad2/4-3</i>	3	260-240	0.63
<i>nad5/2-1</i>	2	215-210	0.05
<i>nad7/1-2</i>	3	158-132	0.50
<i>nad3/rps12</i>	1	253	0

Legends of figures

Figure 1 Neighbor Joining dendrogram of 77 *Citrus* accessions and related genera based on analysis of 4 polymorphic mitochondrial PCR markers. Bootstrap values shown based on 500 resamplings.

Figure 2. Analysis of PCR amplification patterns obtained with total DNA of the 24 genotypes and the new intergenic mitochondrial-specific primers, (A) *nad3/rps12*; (B) *nad2/4-3* primer; (C) *nad2/5-4* primer; (D) *nad5/2-1* primer and (E) *nad7/1-2* (a) primers, on polyacrylamid gel. 1-24: 1 *Psidium acutangulum*, 2 *P. guajava* 'Beaumont', 3 *P. guajava* 'Yellow', 4 *Theobroma cacao* 'Forestaro', 5 *T. cacao* 'Criollo', 6 *Coffea arabica*., 7 *C. canephora*, 8 *Hevea benthamiana*, 9 *H. brasiliensis*, 10 *Mangifera indica* 'Mulgoba', 11 *M. laurina*, 12 *M. indica* L., 13 *M. indica* 'Leonard', 14 *M. indica* 'Mangue blanche', 15 *Gossypium hirsutum*, 16 *G. barbadense*, 17 *Arabidopsis thaliana* 'C24', 18 *A. thaliana* 'Landsberg erecta', 19 *Citrus reticulata* 'Willow leaf', 20 *C. maxima* 'Sans pépins', 21 *C. medica* 'Corsican', 22 *Poncirus trifoliata* 'Pomeroy', 23 *Fortunella japonica* 'Marumi', 24 *Murraya paniculata*.



RESUME

Les agrumes sont cultivés dans les régions semi-arides où ils peuvent être confrontés à une augmentation de la salinité des sols. Etant sensibles au stress salin et à plusieurs contraintes biotiques, les agrumes doivent être greffés sur des porte-greffe cumulant des traits de tolérances biotiques et abiotiques. Il n'existait pas de porte-greffe tolérant à la salinité, tout en étant résistant au virus de la tristeza. Un nouveau porte-greffe allotétraploïde (FLHORAG1), issu de la fusion entre les protoplastes de *Poncirus trifoliata* et de *Citrus deliciosa*, a été créé par le CIRAD. Il est tolérant au sel et résistant au virus de la tristeza. Dans notre étude, nous avons comparé le comportement du FLHORAG1 à celui de ses deux parents diploïdes et à celui des autotétraploïdes respectifs en situation de stress salin. Nous avons comparé ces génotypes au niveau physiologique (mesures de perte d'eau des feuilles, d'accumulation ionique et de fluorescence chlorophyllienne), mais également au niveau moléculaire par les techniques de cDNA-AFLP et de RT-PCR en temps réel. Nos résultats suggèrent que la tolérance au stress salin chez les porte-greffe tétraploïdes (auto- et allo-) est dépendante de l'application d'un déficit hydrique. Il semble en effet que si le stress salin appliqué n'est pas associé avec un déficit hydrique, les porte-greffe tétraploïdes ne sont pas plus tolérants que les diploïdes. Le FLHORAG1 présentait une tolérance accrue à de fortes concentrations de sel. Cette plus grande tolérance est en accord avec la surexpression observée des gènes codant pour les effecteurs impliqués dans la perception et la transduction du signal, dans le transport ionique et dans l'ajustement osmotique. Les variétés greffées sur le FLHORAG1 sont sensibles à une forte contrainte saline (sans limitation en eau), le FLHORAG1 étant incapable de limiter le transfert des ions vers les parties aériennes

Mots clés: agrume, porte-greffe, tétraploïdie, stress salin, déficit hydrique, greffon.

ABSTRACT

Citrus are cultivated in semi-arid regions where they are confronted to an increase of soil salinity. Citrus are sensitive to salt stress and several biotic factors. In order to face up to those constraints, citrus scions must be grafted on rootstocks cumulating traits of tolerance to biotic and abiotic stresses. Nowadays, there is no rootstock able to tolerate salt and also the tristeza virus. A new allotetraploid rootstock (FLHORAG1), obtained by fusion between protoplasts of *Poncirus trifoliata* and *Citrus deliciosa*, has been made by CIRAD. It is salt tolerant and tristeza virus resistant. In our study, we compare the FLHORAG1 behavior to its diploid and autotetraploid parents in salt stress condition. We compared those genotypes physiologically (leaf water content, ion accumulation and chlorophyll fluorescence), and also molecularly by cDNA-AFLP and real time RT-PCR techniques. Our results suggest that citrus salt stress tolerance of tetraploid rootstocks (auto- and allo-) is dependent of a water deficit application. When the applied salt stress is not associated with a water deficit, tetraploid rootstocks are not more salt tolerant than diploids. FLHORAG1 showed a high tolerance to high salt concentrations. This higher tolerance was in agreement with an up-regulation of the expression of genes coding for effectors implicated in signal perception and transduction, in ion transport and in osmotic adjustment. Varieties grafted on FLHORAG1 were sensitive to high salt stress concentrations (no water limitation), FLHORAG1 being unable to limit the transfer of ions in the scion.

Keywords: citrus, rootstocks, tetraploidy, salt stress, water deficit, scion.

