

# Identification de porte-greffe d'agrumes par électrophorèse des protéines de l'écorce.

**J.M. ORTIZ, J. GUERRI et P. MORENO\***

IDENTIFICATION DE PORTE-GREFFE D'AGRUMES PAR ELECTROPHORESE DES PROTEINES DE L'ECORCE.

J.M. ORTIZ, J. GUERRI et P. MORENO.

*Fruits*, Jul.-aug. 1983, vol. 38, n° 7-8, p. 563-566.

RESUME - On a identifié les principaux porte-greffe d'agrumes espagnols par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) d'extraits d'écorce du tronc. Les conditions de culture, l'âge des arbres ou la variété greffée modifient très peu les protéinogrammes correspondants. Sur des arbres atteints de Tristeza, l'intensité d'une des bandes est réduite, sans que cela empêche leur identification. Etant donné que la méthode décrite résout la distinction des porte-greffe et utilise un matériel disponible en n'importe quelle circonstance, cela montre son grand intérêt pour l'identification de porte-greffe d'agrumes dans les plantations jeunes ou vieilles ainsi que pour la caractérisation et l'enregistrement en banques de germoplasmes.

L'identification du porte-greffe sur lequel est greffée une variété est un des problèmes qui se pose fréquemment dans les plantations d'agrumes. Cette identification devra être faite en utilisant une méthode rapide et fiable, en tenant compte du matériel végétal disponible qui se réduit habituellement à la zone radiculaire et à la partie inférieure du tronc.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour l'identification de porte-greffe, parmi lesquelles il faut signaler : a) la morphologie du tronc et de la zone d'union ainsi que l'aspect des repousses du porte-greffe s'il y en a (BITTERS, 1948 ; BENATENA, 1953) ; b) essais colorimétriques avec des extraits d'écorce (HALMA et HAAS, 1929) ; c) études anatomiques (SCHNEIDER, 1955 ; ORTIZ, 1978) ; d) analyse des composants biochimiques, parmi lesquels les huiles essentielles (PIERINGER et al., 1964), flavonoïdes et coumarines (TATUM et al.,

1974), cires de la cuticule (FREEMAN et al., 1979), peroxidases (UENO, 1976), et protéines de feuilles et d'écorce (PRIMO et GONZALEZ-SICILIA, 1972 ; ORTIZ et al., 1981).

Dans ce travail, l'analyse des protéines de l'écorce du porte-greffe a été abordée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS (dodecyl sulfate de sodium) afin d'étudier les différences existant entre divers porte-greffe.

## MATERIEL ET METHODES

Les porte-greffe choisis furent bigaradier (*Citrus aurantium* L.), *C. macrophylla* WESTER, citrange Troyer (*C. sinensis* (L.) OSBECK x *Poncirus trifoliata* (L.) RAF.) et mandarinier Cléopâtre (*C. reshni* HORT ex. TAN.), qui sont les plus couramment utilisés en Espagne et qui représentent actuellement plus de 90 p. 100 des porte-greffe de toutes les plantations espagnoles d'agrumes.

\* - Departamento Nacional de Citricultura, CRIDA-07 (Levante) I.N.I.A. - Apdo Oficial - MONCADA (VALENCIA) Espagne.

Des morceaux d'écorce, de 2 cm de largeur et 3 cm de longueur environ, ont été pris juste sous l'union porte-greffe-greffon, ou à 20 cm au-dessus du niveau du sol, dans le cas de repousses ou de plantes sans greffer. Les échantillons ainsi obtenus ont été lyophilisés, puis pulvérisés dans un broyeur à billes. Les extraits ont été pré-

Troyer (figure 1,2) a des valeurs densitométriques élevées dans les pics 1 et 5 et des valeurs basses dans les pics 3 et 4, en contraste avec les autres porte-greffe de la figure. L'intensité du pic 6 est élevée mais ce détail ne semble pas spécifique du citrange Troyer. *C. macrophylla* (figure 1,3) donne un densitogramme avec les pics 3 et 4 élevés

TABLEAU 1 - Matériel végétal étudié.

Porte-greffe	Greffon	Localité
<i>C. macrophylla</i>	citronnier Verna	Orihuela (Alicante)
citrange Troyer	oranger New Hall	Rafelguaraf (Valencia)
mandarinier Cléopâtre	oranger Navelino	Sagunto (Valencia)
bigaradier (1)		Moncada (Valencia)
bigaradier (1)		Burjasot (Valencia)
bigaradier (1)	oranger Blanca	Orihuela (Alicante)
bigaradier (1)	oranger W. Navel	Moncada (Valencia)
bigaradier (1)	clémentinier Fino	Rafelguaraf (Valencia)
bigaradier (1)	pamplemousse Marsh	Rafelguaraf (Valencia)
bigaradier (2)	citronnier Verna	Beniel (Alicante)
bigaradier (2)	oranger douce	San Miguel de S. (Alicante)
bigaradier (2)	oranger Navelino	Orihuela (Alicante)

(1) - cultivé en serre - (2) plants surgreffés.

parés par homogénéisation de 0,1 g de poudre lyophilisée dans 6 ml de solution tampon tris-phosphorique 0,26 M, pH 6,9, à l'aide d'un broyeur à tige type Polytron. La séparation des protéines par SDS-PAGE a été effectuée selon la méthode décrite par CONEJERO et SEMANCIK (1977).

La lecture densitométrique a été effectuée à 550 nm avec un densitomètre Beckman CDS-100F.

Pour étudier l'influence de l'âge et des conditions de culture des arbres dans les protéinogrammes, des échantillons d'écorce de bigaradier ont été pris sur des jeunes plantes non greffées cultivées en serre à 18-24°C, des repousses sans greffer d'arbres du terrain ou surgreffées avec des variétés cultivées dans d'autres zones agrumicoles.

Dans le tableau 1 sont décrites l'origine et les conditions de culture des plantes analysées.

## RESULTATS

La figure 1 présente les diagrammes des électrophorèses et les profils densitométriques des protéines des quatre porte-greffe étudiés. Dans tous les cas, un nombre élevé de bandes a été résolu, et les plus significatives ont été sélectionnées pour comparer les porte-greffe. Ces bandes ont été numérotées de 1 à 7 et sont définies par leur Rf.

La courbe de densité qui correspond au bigaradier (figure 1,1) a les pics 3, 4 et 6 très élevés et c'est la seule à présenter le pic 7 clairement défini. Celle du citrange

comme le bigaradier et le mandarinier Cléopâtre (figure 1,4) et le pic 6 avec une valeur intermédiaire entre celle des deux porte-greffe. Cependant, l'existence du pic 2 est le détail le plus caractéristique de cette courbe, car il n'est pas observé dans les autres porte-greffe. Finalement, sur la courbe de densité du mandarinier Cléopâtre (figure 1,4) on détecte un nombre plus réduit de pics sur le profil général en comparaison avec les autres porte-greffe. Les pics les plus importants sont les 3, 4 et 6, avec un maximum pour le 4 et un minimum pour le 6 en comparant avec les autres cas étudiés.

Les protéinogrammes obtenus avec l'écorce de bigaradiers cultivés dans les conditions du tableau 1 furent semblables dans tous les cas, ce qui semble indiquer que la composition protéique de l'écorce est caractéristique de chaque espèce et qu'elle est peu affectée par la variété greffée ou les conditions écologiques de la culture.

La figure 2 montre les courbes de densité obtenues à partir d'une repousse de 1,5-2 cm de diamètre du porte-greffe d'un arbre de 'Washington Navel' sur bigaradier d'à peu près 30 ans (figure 2,1), un bigaradier de semis de deux ans cultivé en serre à 18-24°C (figure 2,2), de l'écorce de bigaradier greffé avec pamplemousse d'à peu près 30 ans (figure 2,3) et de l'écorce de bigaradier greffé avec 'Navelina' et surgreffé de citronnier d'à peu près 15 ans (figure 2,4). La seule différence appréciée parmi ces échantillons est la présence d'une bande de basse intensité (bande 4') dans les courbes de densité des bigaradiers greffés, qui ne s'observe pas dans les bigaradiers de semis ni dans les repousses sans greffer.

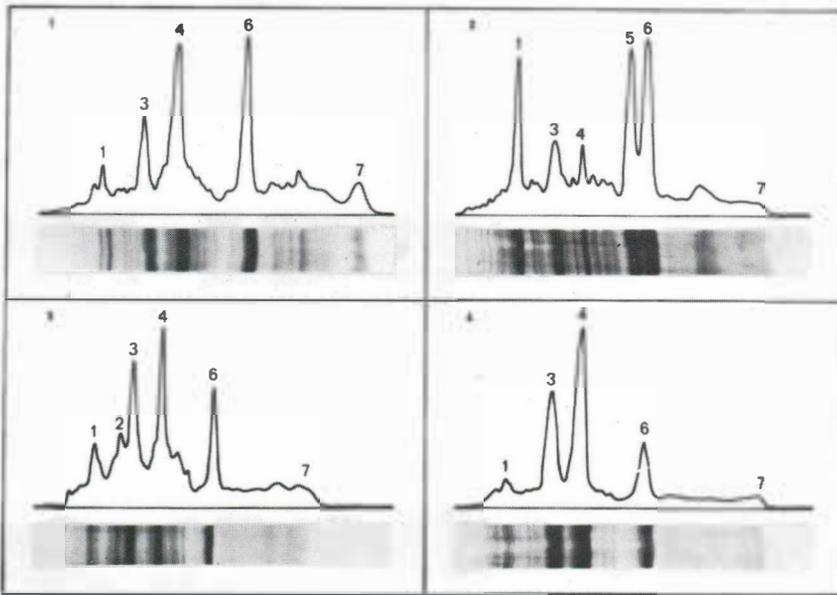


Figure 1 - Protéinogrammes et profils densitométriques d'écorce de : 1) bigaradier, 2) citrange Troyer, 3) *Citrus macrophylla*, 4) mandarinier Cléopâtre.

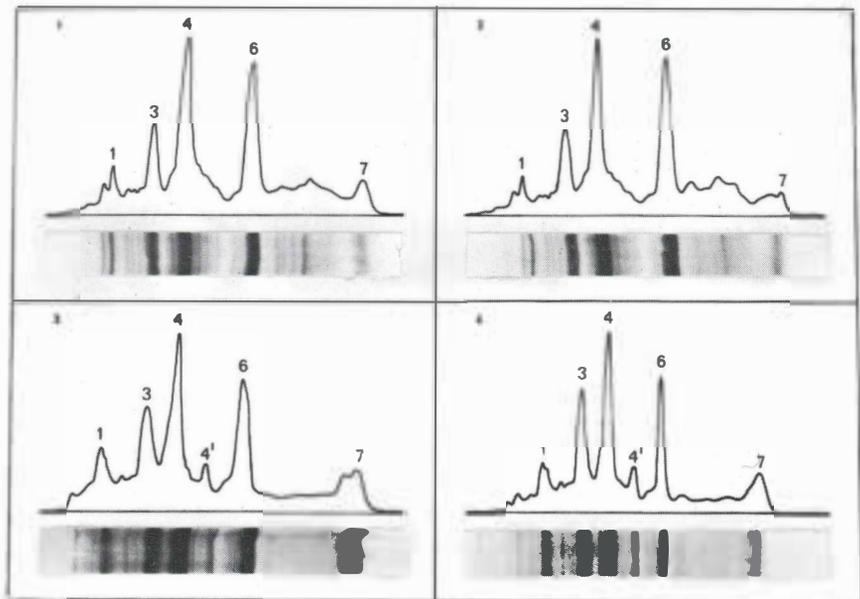


Figure 2 - Protéinogrammes et profils densitométriques d'écorce de bigaradier : 1) arbre adulte, sur le terrain ; 2) plante de semis de 2 ans, en serre ; 3) porte-greffe greffé avec pamplemousse ; 4) porte-greffe greffé avec Navelina et surgreffé avec citronnier.

Cette différence peut être due à la présence du greffon ou à la différence d'âge entre l'écorce des échantillons greffés et ceux sans greffer. Les protéinogrammes 3 et 4 de cette figure sont pratiquement identiques malgré les différences des variétés greffées, l'âge des arbres et les conditions de culture.

### DISCUSSION

Les résultats obtenus en séparant les protéines de l'écorce par la méthode SDS-PAGE indiquent que cette méthode est adéquate pour distinguer de façon nette les porte-greffe essayés. D'autre part, les analyses effectuées par cette méthode avec différents bigaradiers indiquent que les effets de la variété greffée, âge et conditions de culture sur le protéinogramme de l'écorce sont minimums et que le profil densitométrique est basiquement le même dans toutes les conditions. La présence du pic 4' dans les cas où le porte-greffe était greffé pourrait être due à l'influence du greffon ou au fait que l'écorce de l'échantillon était beaucoup plus vieille que chez les bigaradiers non greffés.

Des études sont en cours sur l'influence de différents états pathologiques dans le protéinogramme de l'écorce et les résultats obtenus jusqu'à ce moment montrent qu'il y a seulement quelques différences quantitatives dans une bande de protéines sur des plantes de bigaradier infectées de Tristeza, sans que le profil général du protéinogramme soit altéré.

L'analyse de protéines de l'écorce par SDS-PAGE, présente face aux méthodes d'identification morphologique, l'avantage de pouvoir être effectuée sur des jeunes plantes et sur des plantes adultes sans repousses du porte-greffe. En comparaison avec les méthodes anatomiques et colorimétriques cette analyse a le double avantage d'être peu affectée par la variété greffée, l'âge et les conditions de culture de la plante, et d'avoir une interprétation plus objective des résultats, puisqu'ils sont quantifiables. D'ailleurs les méthodes d'identification par analyse de différents composants biochimiques sont basées généralement sur des substances présentes dans des organes comme les feuilles, fruits, etc. qui habituellement ne sont pas disponibles dans les porte-greffe. Cette limitation peut être évitée avec la méthode utilisée dans ce travail.

L'identification du porte-greffe dans de vieilles plantations peut être importante dans les cas d'estimations économiques ou lorsque l'on désire surgreffer pour changer la variété. Cette méthode peut aussi être intéressante pour vérifier l'authenticité du porte-greffe dans les plantes provenant de pépinières qui auraient un comportement anormal, ainsi que pour la sélection de plantes zygotiques venant d'hybridation. Finalement la caractérisation par le profil de protéines de l'écorce, selon la méthode utilisée dans ce travail, pourrait avoir application dans le classement et l'enregistrement de matériel végétal pour l'établissement de banques de germoplasmes.

### BIBLIOGRAPHIE

- BENATENA (H.N.). 1953.  
Identificación del portainjerto en Citrus.  
*IDIA*, 70 (10), 6-12.
- BITTERS (W.P.). 1948.  
Rootstock identification for oranges.  
*Citrus Leaves*, 28 (7), 6-9.
- CONEJERO (V.) et SEMANCIK (J.S.). 1977.  
Analysis of the proteins in crude plant extracts by polyacrylamide slab gel electrophoresis.  
*Phytopathology*, 67, 1424-1427.
- FREEMAN (B.), ALBRIGO (L.G.) et BIGGS (R.H.). 1979.  
Ultrastructure and chemistry of cuticular waxes of developing Citrus leaves and fruits.  
*J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 104 (6), 801-808.
- HALMA (F.F.) et HAAS (A.R.C.). 1929.  
Citrus rootstock identification.  
*Calif. Citrog.*, 14, 162.
- ORTIZ (J.M.). 1978.  
Influencia del patrón y del injerto de los cítricos sobre el grosor de corteza y de floema funcional y sobre el vigor general del árbol.  
*Colección : Tesis doctorales I.N.I.A. n° 11, 57 p.*
- ORTIZ (J.M.), TADEO (J.L.), GUERRI (J.) et FORNER (J.B.). 1981.  
Distinction between hybrid and nucellar citrus trees by analysis of their biochemical compounds.  
*Proc. Int. Soc. Citriculture, Japan* 1, 4-7.
- PIERINGER (A.P.), EDWARDS (G.J.) et WOLFORD (R.W.). 1964.  
The identification of citrus species and varieties by instrumental analysis of citrus leaf oils.  
*Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 84, 204-212.
- PRIMO (E.) et GONZALEZ-SICILIA (E.). 1972.  
Diferenciación de agrios por electroforesis de proteínas en gel de acrilamida.  
*Anales del I.N.I.A., Serie : Prod. Vegetal.*, 2 (10), 175-199.
- SCHNEIDER (H.). 1955.  
Ontogeny of lemon tree bark.  
*Amer. Jour. of Bot.*, 42, 893-905.
- TATUM (J.H.), BERRY (R.E.) et HEARN (C.J.). 1974.  
Characterization of citrus cultivars and separation of nucellar and zygotic seedlings by thin-layer chromatography.  
*Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 87, 75-81.
- UENO (I.). 1976.  
Application of zymography to citrus breeding. II.- Variations in peroxidase isozymes for species, varieties and strains of Citrus and its relatives.  
*Bull. Fruit Tree Res. Sta. B*, 3, 9-24.