



**HAL**  
open science

# Etudes physiologiques et génétiques de caractères morpho-physico-chimiques des fruits d'agrumes au cours de la maturation jusqu'à l'abscission

Hajer Khefifi

► **To cite this version:**

Hajer Khefifi. Etudes physiologiques et génétiques de caractères morpho-physico-chimiques des fruits d'agrumes au cours de la maturation jusqu'à l'abscission. Génétique des plantes. Montpellier SupAgro; Institut national agronomique de Tunisie, 2015. Français. NNT : 2015NSAM0013 . tel-01403283

**HAL Id: tel-01403283**

**<https://theses.hal.science/tel-01403283>**

Submitted on 25 Nov 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

**Délivré par SupAgro Montpellier**

**Préparée au sein de l'école doctorale GAIA  
Et de l'unité de recherche AGAP**

**Spécialité : Biologie intégrative des plantes**

**Présentée par Hajer KHEFIFI**

**Etudes physiologiques et génétiques de  
caractères morpho-physico-chimiques des  
fruits d'agrumes au cours de la maturation  
jusqu'à l'abscission**

**Soutenue le 22 septembre 2015 devant le jury composé de**

Mme. Elisabeth Dirlwanger, DR, INRA	Rapporteur
M. Jean-Louis Julien, Professeur, Univ. Blaise Pascal Clermont-Ferrand	Rapporteur
M. Jean-Luc Regnard, Professeur, SupAgro Montpellier	Examineur
Mme Quilot Bénédicte, CR, INRA Avignon	Examinatrice
M. Raphaël Morillon, Chercheur, CIRAD	Directeur de thèse
M. Mehdi Ben Mimoun, Professeur, INAT	Co-directeur de thèse
M. François Luro, CR, INRA Corse	Invité
M. Timothy Tranbarger, CR, IRD Montpellier	Invité

Thèse pour l'obtention du titre de Docteur

**Etudes physiologiques et génétiques de caractères  
morpho-physico-chimiques des fruits d'agrumes au  
cours de la maturation jusqu'à l'abscission**

Hajer KHEFIFI



©C.Maitre, INRA

Soutenue le 22 septembre 2015 et encadré par :

**M. Raphaël Morillon**, Chercheur, CIRAD

**M. François Luro**, CR, INRA

**M. Mehdi Ben Mimoun**, Professeur

Directeur de thèse

Encadrant de thèse

Co-directeur de thèse

# *Dédicace*

A mes grands parents

A mes parents

A mes frères

A ma sœur

A mon fiancé

A toute ma famille

# ***Remerciements***

J'exprime ma profonde gratitude à M. Raphaël Morillon, mon directeur de thèse, pour son intérêt, son important investissement, ses conseils, sa disponibilité et sa confiance qui ont été une grande source d'appui, de motivation et d'encouragement pour mener à bien ce travail. Ce travail n'aurait pas abouti sans vos efforts bienveillants. Merci !

J'adresse mes plus vifs remerciements à M. François Luro, mon encadrant qui a suivi ce travail de près pendant ces quatre ans. Je le remercie pour ses conseils, son aide précieuse, ses efforts, sa patience et sa gentillesse. Tes recommandations et tes conseils m'ont été précieux. Merci !

Merci à M. Mehdi Ben Mimoun mon co-directeur de thèse pour son aide et sa participation à ce travail.

Mes remerciements vont également aux membres de mes comités de pilotage : M. Francisco Tadeo et M. Jean Luc Regnard pour leurs conseils judicieux, leurs exigences scientifiques et leurs remarques constructives.

Je tiens également à remercier, Mme Elisabeth Dirlewanger, Mme Bénédicte Quilot, M. Jean-Louis Julien et M. Timothy Tranbarger pour avoir accepté de consacrer de leur temps à l'évaluation de cette thèse.

Mes remerciements se dirigent également aux financeurs de ces travaux : le Cirad, l'Inra et l'Université de Carthage.

Merci à M. Laurent Gomez de m'avoir accueillie au sein de l'unité de recherche Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, à l'Inra d'Avignon.

Je suis très reconnaissante envers Mme Doriane Bancel, qui m'a encadrée lors de mon stage effectué à l'Inra d'Avignon. Merci beaucoup pour ta disponibilité, ta modestie, tes compétences, ta rigueur et ta gentillesse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Mme Agnès Doligez pour le temps qu'elle a consacré pour m'aider à comprendre la méthodologie de la cartographie génétique et la détection des QTL et pour répondre à toutes mes questions.

Merci à M. Patrick Ollitrault qui nous a fourni les données de génotypage de la population clémentinier x mandarinier.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Marie-France Duval qui m'a offert l'occasion de participer à la journée des doctorants 2015 à SupAgro Montpellier.

Un grand merci à Rim Selmane stagiaire à l'INAT pour son aide et sa contribution.

Que tous les personnels Inra-Cirad du Centre Inra de Corse qui m'ont aidés et m'ont soutenus par leurs conseils et encouragements notamment Timi, Jean-Luc, Jean Charles, Olivier, Yann, Paul-Eric, Isabelle, Jeanine, Jean Bouffin, Thibaut, Jérôme, Camille, Christian, Albert, François, Emmanuel, Josée et bien d'autres trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Pour tous les aspects administratifs, je remercie Patricia, Véro, Brigitte. Je remercie également Simone, Pauline, Renaud et Christophe.

Un grand merci à Gilles, mon voisin de bureau pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse. Merci à Laurent pour ses cours de « R » et sa gentillesse. Merci à Franck pour ses conseils, son aide et sa bonne humeur. Merci à Jean Marc pour son soutien, son écoute et ses encouragements. Merci à Alexandra et à Marie, doctorantes, pour les bons moments passés ensemble. Je vous souhaite bon courage pour la suite.

Une autre pensée pour tous les « gens du voyage » : CDD, stagiaires, thésards que j'ai eu le plaisir de croiser pendant ces quelques années : Camilla, Sandrine, Katia, Angèle, Chloé, Charlotte, Maude, Nadia, Haifa, Ahlem, Vincent, Victoire, Juliette, Florian, Andria, Audray, Emilie, Simon, Marion, Matthieu et Marine.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse et à une bonne ambiance générale que ce soit pour un coup de main au niveau administratif un échange instructif, un mot d'encouragement, un bon moment à la pause-café...

Merci à tous mes amies qui m'ont apportés leur soutien : Antonella, Sana, Souha, Noémie, Natacha et Pauline. Merci aussi à tous mes colocataires qui ont défilés au cours de ces années au bâtiment social pour la bonne ambiance et tous les bons moments passés ensemble.

A mon fiancé...Merci pour tout. Pour ton soutien indéfectible, tes attentions, ta patience, tes encouragements...Sans ton soutien la dernière année de mon aventure aurait été bien difficile.

Merci du fond de cœur à ma famille que j'aime plus que tout et qui m'a beaucoup manquée pendant ces années. Avec certitude, je n'en serais jamais arrivée là sans le soutien et les sacrifices de mes parents. Avec toute ma reconnaissance, ma gratitude, mon amour je vous remercie ! Merci pour votre présence, vos encouragements, votre écoute. Merci pour avoir toujours cru en moi et m'avoir toujours soutenue et suivie quels que soient mes choix et mes destinations... ! Cette thèse est pour vous...

الحمد لله الذي هداني لأقرب من هذا رشداً<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Je remercie Dieu qui m'a aidé à finir ma thèse

"Dieu se laisse entrevoir dans les choses créées, et dans toutes, dans les plus petites même, quelle force ! Quelle sagesse ! Quelle inexplicable perfection ! Les animaux, les végétaux, les minéraux, empruntant et rendant à la terre les éléments qui servent à leur formation ; la terre emportée dans son cours immuable autour du soleil dont elle reçoit la vie, le soleil lui-même avec les autres astres et le système entier des étoiles suspendu et mis en mouvement dans l'abîme du vide par Celui qu'on ne peut comprendre, le premier Moteur, l'Être des êtres, la Cause des causes, le Protecteur universel et le Souverain Artisan du monde."

**Charles LINNÉ (Linné, 1832)**

## Résumé

Le contrôle de la qualité des fruits est un objectif de recherche agronomique, génétique mais également de production. La notion de qualité est cruciale pour les fruits destinés au commerce du fruit frais. Chez les agrumes, fruitier non climactérique, elle est définie sur l'arbre et utilisée pour déclencher la récolte qui doit précéder l'abscission des fruits. Néanmoins cette chute de fruit est parfois très proche du stade de maturité et occasionne donc des pertes du fait de délais trop courts pour assurer la récolte. Ceci est généralement observé chez les orangers cultivés en Espagne et en Tunisie. Par ailleurs, la qualité d'un agrume est souvent définie par la couleur de peau, la taille du fruit, l'absence de pépin, l'arôme et les teneurs en jus, en sucres et en acidité. Si l'absence de pépin peut être obtenue par la mutation induite ou par la triploïdie, le contrôle de la variation des autres caractères repose sur de nombreux facteurs: la variété, l'interaction avec le porte-greffe, les effets de l'environnement et les techniques culturales. Parmi eux le génotype variétal, c'est-à-dire sa structure génétique héritée de ses parents est un facteur prépondérant pour atteindre le niveau d'amélioration attendu. L'obtention d'une structure génétique adaptée aux objectifs de production n'est pas aisée car les caractéristiques liées à la reproduction telles que la polyembryonie, la phase juvénile ou l'auto-incompatibilité gamétique, sont contraignantes chez les agrumes. Dans le cadre de ce travail, nous avons eu pour objectif de développer des connaissances sur la variation des caractères de la qualité du fruit, en y incluant l'abscission, mais également sur leur héritabilité et leur hérédité afin de faciliter les programmes de sélection et de création variétale.

Nous avons tout d'abord étudié la variation de l'abscission chez plusieurs variétés d'orangers sur 3 sites, en Tunisie en Espagne et en Corse. Cette étude démontre que pour des variétés identiques, le processus d'abscission mesurée via la diminution de la force de détachement du fruit du pédoncule (FDF), est très dépendante de l'environnement et non des caractères de qualité du fruit. De façon originale la Corse ne semble pas être favorable à l'expression de ce caractère. Parmi les facteurs environnementaux décrits sur les trois sites, celui de l'augmentation du nombre de jours favorable à la croissance (température moyenne  $\geq 13^{\circ}\text{C}$ ) en fin d'hiver semble être à l'origine de la chute massive et soudaine des fruits. Néanmoins, en Corse, la FDF peut aussi diminuer au cours de la maturation sur d'autres agrumes que les oranges.

L'analyse de l'hérédité des caractères de la qualité des fruits et de leur abscission a été réalisée par une approche de la ségrégation de QTLs dans une population de 116 hybrides issus d'un croisement de type backcross (clémentinier  $\times$  mandarinier), le clémentinier étant déjà un hybride (mandarinier  $\times$  oranger). Les analyses ont été reproduites sur deux campagnes de production à plusieurs dates de maturité et bornées par celles des deux parents. La plupart des caractères ont une variation importante et une hérédité transgressive découlant de l'hétérozygotie élevée des génomes parentaux. Trois cartes génétiques ont été développées (les parentales et la consensus) à l'aide de marqueurs SNP et SSR couvrant environ 75% du génome de référence. Après estimation de l'effet aléatoire sur la variance des caractères (BLUP), des QTL de chacun des caractères ont été détectés (1 QTL pour l'acidité, le citrate, la teneur en jus, la TSS, la FDF à 5 QTL pour l'indice  $a^*$  de coloration). La plupart d'entre eux ne sont détectés qu'à une seule date de maturation.

La stabilité interannuelle et inter-population de ces QTL devra être vérifiée avant une possible utilisation des marqueurs liés dans les programmes d'amélioration.

**Mots clés :** Agrumes, maturation, abscission, environnement, FDF, cartographie, QTL



## **Abstract**

Fruit quality control is an agronomic, genetics and production research objective. The concept of quality is crucial for fruit produced for the fresh fruit market. In citrus, which are non-climacteric fruit, quality traits in the tree is set to trigger the harvest time that must precede fruit abscission. However, this fruit drop is sometimes very close to the stage of maturity and therefore causes losses because of shorter time to ensure the harvest. This is usually observed in orange grown in Spain and Tunisia. Furthermore, the quality of a citrus fruit is often defined by the skin color, fruit size, seedlessness, aroma and juice content, sugar and acidity. If seedlessness can be obtained by induced mutations or triploidy, the control of the change in other characters is based on many factors: variety, interaction with the rootstock, environmental impact and cultivation techniques. Among them, the varietal genotype, which means the genetic structure inherited from the parents, is a key factor to achieve the expected level of improvement in breeding. In citrus, obtaining a genetic structure adapted to production targets is not easy because the characteristics associated with reproduction such as polyembryony, juvenility or gamete self-incompatibility. In the present work, we aimed to develop knowledge on the variation of fruit quality traits by including abscission, heritability and traits inheritance to facilitate breeding programs.

We first studied the variation of the abscission in several varieties of orange on 3 sites, Tunisia, Spain and Corsica. This study showed that for the same varieties, the process of abscission measured by investigating the decrease the fruit detachment force (FDF) required to separate the fruit from the calyx, was very dependent on the environment, but not on the fruit quality traits. Interestingly, Corsica does not seem favorable to the expression of this trait. Among the environmental factors described on the three locations, the increase of the number of days that favor growth (average temperature  $\geq 13$  °C) in late winter seems to be the cause of the sudden and massive fruit drop. Nevertheless, in Corsica, the FDF can also decrease during maturation in other citrus than oranges.

The analysis of inheritance of fruit quality traits and abscission was achieved by investigating the segregation of QTLs in a population of 116 hybrids resulting from a backcross (clementine  $\times$  mandarin), clementine being itself a hybrid (mandarin  $\times$  orange). Analyzes were replicated two consecutive years at several maturity dates which were bounded by maturity dates of both parents. Most traits presented a significant variation and a transgressive inheritance arising from the high heterozygosity of parental genomes. Three genetic maps have been developed (parental and consensus) using SSR and SNP markers covering about 75% of the reference genome. After estimating the random effect on the variance of the traits (BLUP), QTLs of each trait were detected (1 QTL for acidity, citrate, juice content, TSS, FDF as well as 5 QTLs for the  $a^*$  color index). Most of them were detected at a single date of maturation.

Interannual and inter-population stability of these QTLs will be checked before any possible use of the linked markers in breeding programs.

**Keywords:** Citrus, maturation, abscission, environment, FDF, cartography, QTL

## **Table des matières**

Résumé.....	7
Abstract .....	8
Introduction bibliographique.....	14
1. Agrumiculture : Importance économique, atouts et contraintes .....	15
1.1. Agrumes : Production, consommation et exportation.....	15
1.2. Taxonomie des agrumes : Richesse et diversité génétique.....	18
1.3. Origine génétique et géographique des citrus cultivés.....	19
1.4. Classification des orangers et des mandariniers .....	21
1.5. Progrès génétiques : Réalisations, atouts et contraintes.....	23
1.6. Etude génétique des caractères quantitatifs .....	27
1.6.1. Génome des agrumes.....	27
1.6.2. Cartes génétiques .....	27
1.6.3. Analyse QTL .....	28
1.6.3.1. Principe et intérêt d'une analyse QTL .....	28
1.6.3.2. Outils et étapes d'une analyse QTL .....	29
1.6.3.2.1. Etablissement d'une carte génétique.....	29
1.6.3.2.2. Phénotypage.....	30
1.6.3.2.3. Cartographie de QTL.....	30
1.6.3.3. Facteurs influençant la détection des QTL .....	31
2. Maturation des fruits des agrumes .....	31
2.1. Morphologie et anatomie du fruit .....	31
2.2. Etapes de croissance et développement du fruit .....	32
2.2.1. Phase de division cellulaire .....	32
2.2.2. Phase de différenciation cellulaire.....	32
2.2.3. Phase de maturation.....	33
2.3. Changements physiologiques et biochimiques au cours de la maturation.....	33
2.3.1. Caractérisation de la maturation .....	33
2.3.2. Les sucres chez les fruits des agrumes .....	34
2.3.2.1. Composition du fruit en sucres .....	34
2.3.2.2. Métabolisme et transport des sucres .....	35
2.3.3. Les acides chez les fruits des agrumes .....	38
2.3.3.1. Composition du fruit en acides organiques .....	38
2.3.3.2. Métabolisme des acides .....	39
2.3.3.3. Transport des acides.....	42
2.3.4. Les métabolites secondaires chez les fruits des agrumes .....	43
2.3.4.1. Composition du fruit en métabolites secondaires .....	43
2.3.4.2. Evolution des métabolites secondaires au cours de la maturation des fruits	43
2.3.4.3. Métabolisme des caroténoïdes .....	44

2.4.	Contrôle de la maturation des fruits des agrumes .....	45
2.4.1.	Effet environnemental .....	45
2.4.2.	Contrôle hormonal.....	47
2.4.3.	Contrôle génétique.....	48
2.4.3.1.	Contrôle génétique de la synthèse des sucres .....	48
2.4.3.2.	Contrôle génétique du métabolisme d'acide citrique.....	50
3.	L'abscission des fruits au cours de la maturation des agrumes.....	52
3.1.	Qu'est-ce que l'abscission ?.....	52
3.2.	Vagues d'abscission.....	52
3.3.	Zones d'abscission .....	53
3.3.1.	Localisation des zones d'abscission .....	53
3.3.2.	Morphologie, Anatomie et métabolisme des zones d'abscission.....	54
3.5.	Contrôle de l'abscission des fruits .....	56
3.5.1.	Effet environnemental .....	56
3.5.2.	Contrôle hormonal.....	57
3.5.3.	Implication des sucres et des acides dans le phénomène d'abscission.....	59
3.5.4.	Contrôle génétique .....	60
3.5.4.1.	Gènes codant pour les enzymes hydrolytiques .....	60
3.5.4.1.1.	Cellulases ou Endo-1,4-β-glucanases ou EC 3.2.1.41 .....	60
3.5.4.1.2.	Polygalacturonases (EC 3.2.1.15).....	61
3.5.4.1.3.	Pectine-méthyl-estérase .....	62
3.5.4.2.	Gènes codant pour les hormones d'abscission.....	63
3.6.	Dernière étape de l'abscission : la Post- abscission.....	65
3.7.	L'abscission est-elle un critère recherché ? .....	65
3.7.1.	Mécanisation de la récolte: l'abscission peut être un critère agronomique recherché ! .....	65
3.7.1.1.	Développement de la récolte mécanique .....	66
3.7.1.2.	Limites et contraintes de la récolte mécanique .....	67
3.7.2.	Preharvest drop : l'abscission est un critère non recherché.....	67
3.7.3.	L'abscission est un critère à contrôler !.....	68
4.	Objectifs de la thèse .....	69
	Matériel et Méthodes.....	71
1.	Dispositifs expérimentaux et Matériel végétal.....	72
1.1.	Premier dispositif expérimental .....	72
1.1.1.	Site expérimental et Matériel végétal .....	72
1.1.2.	Prélèvement et échantillonnage .....	74
1.2.	Deuxième dispositif expérimental .....	74
1.2.1.	Matériel végétal .....	74
1.2.2.	Prélèvement et échantillonnage .....	75
1.3.	Troisième dispositif expérimental.....	75
1.3.1.	Site expérimental .....	75
1.3.2.	Matériel végétal .....	76

1.3.3. Prélèvement et échantillonnage .....	76
2. Méthodes .....	78
2.1. Enregistrement des données climatiques .....	78
2.2. Phénotypage et suivi des paramètres de la qualité du fruit et d'abscission .....	78
2.2.1. Suivi des paramètres physico-chimiques du fruit .....	78
2.2.1.1. Paramètres physiques du fruit .....	78
2.2.1.2. Paramètres biochimiques du fruit .....	79
2.2.2. Suivi de l'évolution de la Force de Détachement du Fruit au cours de la maturation.....	80
2.2.3. Analyses biochimiques .....	80
2.2.3.1. Préparation des échantillons .....	81
2.2.3.2. Extraction des sucres et des acides .....	81
2.2.3.3. Dosage par méthode enzymatique des sucres .....	81
2.2.3.4. Dosage par méthode enzymatique des acides organiques .....	83
2.2.3.5. Dosage de l'acide citrique .....	84
2.2.3.6. Dosage de l'acide malique .....	85
2.3. Analyses statistiques .....	86
2.4. Génotypage et analyses moléculaires .....	88
2.4.1. Extraction de l'ADN.....	88
2.4.2. Vérification de la qualité d'ADN par migration sur gel d'agarose .....	88
2.4.3. Dosage de l'ADN .....	89
2.4.4. Choix des marqueurs moléculaires .....	89
2.4.5. Réactions PCR.....	89
2.4.6. Electrophorèse en gel de polyacrylamide .....	90
2.4.7. Marqueurs moléculaires : Polymorphisme et codage.....	91
2.5. Analyses bio-informatiques .....	92
2.5.1. Construction des cartes génétiques .....	92
2.5.2. Détection des QTL.....	94
Chapitre I: Effet de l'environnement et de la maturité des fruits sur l'abscission .....	95
1. Manuscrit sur l'effet de l'environnement et de la maturité sur l'abscission .....	97
Chapitre II: Etablissement des cartes génétiques .....	120
1. Introduction .....	121
2. Résultats.....	122
2.1. Cartes parentales .....	122
2.2. Carte consensus.....	127
2.3. Fréquence et répartition des marqueurs avec distorsion de ségrégation .....	130
2.4. Cartographie comparée .....	132
2.4.1. Comparaison de la carte du clémentinier avec la carte de référence du clémentinier .....	132
2.4.2. Comparaison de la carte consensus aux deux cartes parentales.....	136
3. Discussion .....	136

3.1. Distorsion de ségrégation.....	136
3.2. Analyse des cartes génétiques.....	138
3.3. Cartographie comparée .....	138
Chapitre III : Détection de QTL des caractères de la qualité des fruits et de l'abscission.....	140
1. Introduction .....	141
2. Détection des QTL de la FDF et des caractères physico-chimiques des fruits .....	141
2.1. Résultats .....	141
2.1.1. Analyse des données phénotypiques .....	141
2.1.1.1. Variation des caractères .....	141
2.1.1.2. Corrélations génétiques.....	147
2.1.1.3. Héritabilité des caractères .....	149
2.1.2. Cartes génétiques .....	150
2.1.3. Identification des QTL.....	151
2.1.3.1. Les QTL identifiés pour chaque caractère .....	156
2.1.3.2. Co-localisations des QTL : pour le même caractère et entre caractères ...	157
2.1.4. Stabilité interannuelle des QTL.....	158
2.2. Discussion .....	161
2.2.1. Analyse des QTL .....	161
2.2.1.1. QTL de la FDF .....	161
2.2.1.2. Les QTL de la couleur du fruit.....	162
2.2.1.3. QTL de la forme du fruit, du diamètre équatorial et du diamètre polaire.	163
2.2.1.4. QTL de la TSS et de l'acidité .....	164
2.2.2. Variance phénotypique expliquée par les QTL .....	164
2.2.3. Co-localisations des QTL .....	165
2.2.4. Stabilité des QTL.....	166
3. Manuscrit sur la détection des QTL de la qualité des fruits.....	167
Discussion et perspectives.....	207
1. L'abscission au cours de la maturation .....	208
1.1. Méthodologie et évaluation de l'abscission.....	208
1.2. Comment l'environnement influence-t-il l'abscission ?.....	209
1.2.1. L'abscission des fruits est-elle due à l'évolution des paramètres des fruits au cours de la maturation ? .....	209
1.2.2. L'abscission des fruits est-elle due à l'effet direct de l'environnement ? ....	210
2. Contrôle génétique de l'abscission et des principaux caractères du fruit à différents dates au cours de la phase de maturation.....	212
2.1. Cartes génétiques .....	212
2.2. Variabilité et héritabilité des caractères .....	213
2.3. QTL détectés .....	213
2.4. Intérêt de l'approche QTL pour l'étude des relations entre caractères et pour l'amélioration.....	214
2.5. Stabilité des QTL .....	215

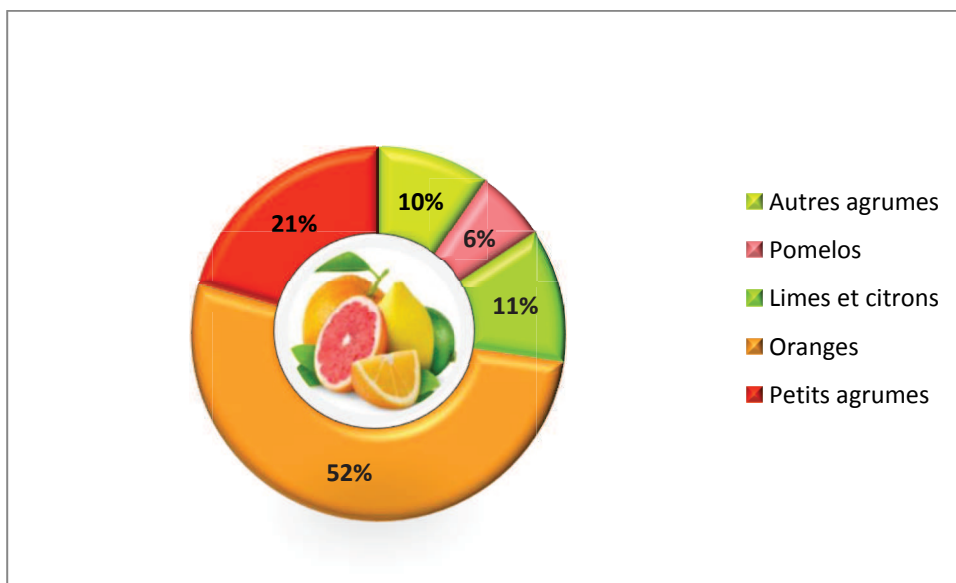
2.6. Abscission et maturation.....	216
Conclusion générale .....	217
1. Existe-t-il des relations entre l'environnement, la maturation et l'abscission?.....	218
2. Etude de déterminisme génétique de la FDF et des paramètres physico-chimiques des fruits.....	219
Références bibliographiques .....	221
Annexes.....	243
1. Annexes des chapitres II et III.....	244
2. Proceeding et participations aux congrès .....	252

## ***Introduction bibliographique***

## 1. Agrumiculture : Importance économique, atouts et contraintes

### 1.1. Agrumes : Production, consommation et exportation

Cultivés à très grande échelle, les agrumes sont en tête des productions fruitières dans le monde. En 2012, la production mondiale a dépassé les 131 millions de tonnes (FAO 2014). Les oranges représentent de loin la plus grosse production d'agrumes avec un pourcentage de 52%. Les petits agrumes occupent le deuxième rang avec une production de 20.6 millions de tonnes, représentant 21% de la production totale d'agrumes. Suivent ensuite les limes et les citrons, les autres agrumes et pour finir les pomelos. Ces derniers occupent la dernière place avec une production de 6.1 millions de tonnes (Figure 1).



**Figure 1.** Pourcentages de la production mondiale des principaux groupes d'agrumes commercialisés pour l'année 2012 (FAO, 2014).

Grâce à leur grande capacité d'adaptation à des conditions pédoclimatiques très différentes, les agrumes sont cultivés dans des zones tempérées chaudes jusqu'aux zones tropicales (entre les 40° de latitudes nord et sud) (Luro *et al.*, 2013). En 2012, la superficie cultivée était de l'ordre de 8,7 millions d'hectares (FAO, 2014), résultant d'une forte augmentation des plantations au cours des dernières décennies. La Chine est le pays dont la superficie agrumicole est la plus importante et représente à elle seule 24% de la surface mondiale (UNCTAD, 2013).

Bien que les agrumes soient produits dans plus de 140 pays, la Chine, le Brésil, les Etats-Unis et le bassin méditerranéen produisent plus de 64% de la production mondiale (Tableau 1) (FAO, 2014). La production du bassin méditerranéen est destinée principalement au



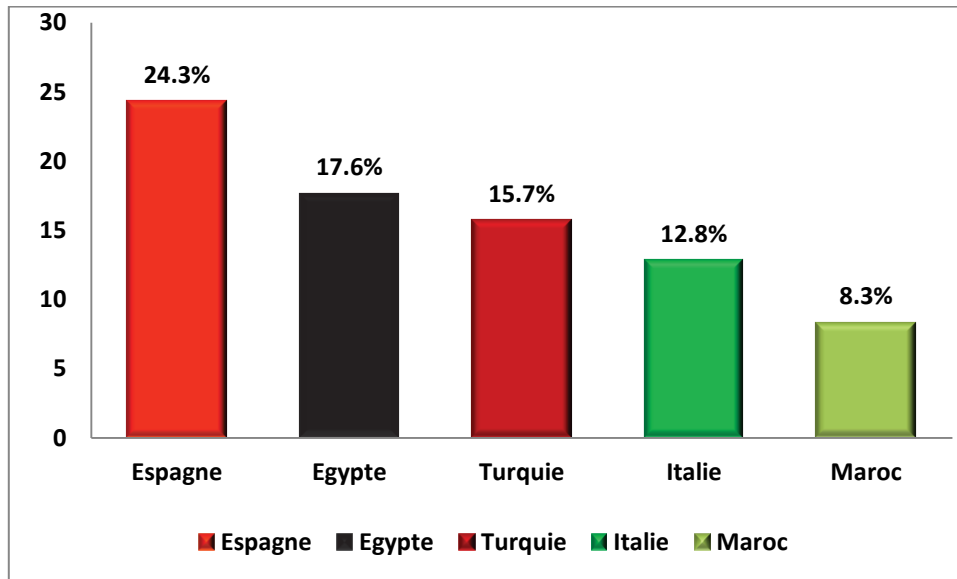
marché du frais. En revanche la plus grande partie de la production des régions tropicales est destinée à la transformation.

**Tableau 1.** Principaux pays et zones producteurs d'agrumes en 2012 (FAO, 2014).

<b>Régions de production</b>	<b>Production (Tonnes)</b>	<b>Part de la production Mondiale (%)</b>
Chine	31 700 000	24.1
Bassin méditerranéen	22 600 263	17.2
Brésil	20 258 500	15.4
Etats Unis	10 619 500	8.1

La transformation des agrumes représente environ un tiers de la production totale, et est dominée par le jus d'orange. La principale caractéristique du marché mondial du jus d'orange est la concentration et la spécialisation géographique de la production. En effet, deux acteurs principaux, l'Etat de Floride aux Etats-Unis et l'Etat de San Paulo au Brésil se partagent ce marché. La production du jus d'orange cumulée entre ces deux acteurs représentait en 2009 environ 85% du marché mondial (Council, 2010).

Le marché des agrumes frais concerne surtout les oranges. En 2012, la consommation mondiale des fruits frais était supérieure à 50 millions de tonnes. Toutefois, ce marché se caractérise par une forte diversification avec les petits agrumes, les citrons, les limes et les pomelos. La production d'oranges est surtout concentrée en Amérique du sud et en Californie alors que la production de mandarines et de petits fruits est localisée en Chine, au Japon et dans le bassin méditerranéen. Il est à signaler que le niveau de qualité le plus haut est obtenu dans le bassin méditerranéen qui représente l'une des principales zones de production des agrumes frais diversifiés (Council, 2010). La part la plus importante de la production dans le bassin méditerranéen est fournie par l'Espagne avec 24% de la production totale de cette zone. Après l'Espagne viennent l'Egypte, la Turquie et l'Italie avec respectivement 17, 15 et 12% de la production méditerranéenne (Figure1) (FAO, 2014).



**Figure 2.** Part des principaux pays producteurs du bassin méditerranéen dans la production méditerranéenne des agrumes (22.6 millions de tonnes) en 2012 (FAO, 2014).

Avec une composition riche en minéraux, en polyphénols, en vitamines, en fibres, en flavonoïdes, en limonoïdes, les agrumes sont bénéfiques pour la santé et préviennent plusieurs maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers, les désordres intestinaux... (Ladanyia, 2008).

Les agrumes sont également utilisés pour l'extraction des huiles essentielles et la fabrication des produits cosmétiques. Les huiles essentielles proviennent de cellules appelées glandes à huiles situées dans l'épiderme (exocarpe) et sont utilisées en tant qu'arômes dans les parfums, les cosmétiques, l'industrie alimentaire et les produits ménagers de nettoyage. La pulpe, sous-produit de l'extraction des jus, est utilisée pour l'alimentation animale (Ocampo, 2008).

Les agrumes sont des fruits fortement demandés sur les marchés internationaux. Plus de 7% de la production mondiale, correspondent à des importations. La Russie représente la première destination des agrumes importés avec un pourcentage de 23%. Ce marché est très demandeur en petits fruits. Au second rang, on trouve l'Union Européenne avec un volume de 1 million de tonnes importées en 2012/2013. Pour cette destination les oranges représentent 71% des agrumes importés (MAPM, 2013).

En 2011, plus de 60% des exportations d'agrumes frais provenaient de l'hémisphère Nord (FAO, 2014). Les pays méditerranéens jouent traditionnellement un rôle prédominant en tant qu'exportateurs d'agrumes frais. La part du bassin méditerranéen dans les exportations représente environ 50% et constitue une ressource financière importante pour ces pays. Les oranges constituent la majeure partie des fruits frais exportés (UNCTAD, 2013). L'Afrique du

sud est le plus gros exportateur d'oranges avec un total de 1 million de tonnes en 2012 ce qui représente 27% du total des oranges exportées. L'Afrique du Sud avec l'Égypte, l'Espagne, les États-Unis, la Turquie et l'Union Européenne exporte 85% des oranges (Moobi, 2013).

Les agrumes constituent un secteur stratégique dans la plupart des pays producteurs jouant ainsi un rôle socio-économique du premier ordre. Sur le plan économique, les agrumes représentent une source importante de recettes pour tous les acteurs de la filière ; agriculteurs, industriels, exportateurs... Sur le plan social, le secteur assure l'emploi d'une main d'œuvre importante. Il s'agit donc d'une filière d'importance économique majeure à l'échelle nationale ainsi qu'à l'échelle internationale (Ladanyia, 2008).

### ***1.2. Taxonomie des agrumes : Richesse et diversité génétique***

Les agrumes comportent une grande diversité d'espèces. Cette diversité n'est pas complètement explorée et exploitée. En fait, les agrumes appartiennent principalement à trois genres botaniques sexuellement compatibles : *Fortunella*, *Poncirus* et *Citrus*. Ces trois genres avec huit autres genres appartiennent à la sous-tribu des *Citrinae*, tribu des *Citreae*, sous-famille des *Aurantioideae*, famille des *Rutaceae* et l'ordre des Géraniales (Swingle, 1967). Les espèces appartenant au genre *Fortunella* donnent des fruits dont la peau est comestible. Le *Poncirus* est monospécifique. Il est utilisé surtout comme porte-greffe du fait des tolérances qu'il porte à plusieurs contraintes biotiques (Gommose à *Phytophthora*, Tristeza, nématodes...) et aux basses températures. Le genre *Citrus* est celui qui regroupe un très grand nombre d'espèces y compris la plupart des espèces cultivées et comestibles. Le nombre d'espèces appartenant à ce genre varie en fonction des classifications des taxonomistes. En effet tandis que Swingle (1967) y répertorie seize espèces, Tanaka (1961) y décrit cent cinquante-six espèces. La classification de Tanaka (1961) reste la plus utilisée, même si tout le monde s'accorde à dire que celle de Swingle se rapproche le plus de la définition d'une espèce. En 1997, Mabberley a proposé une autre classification qui regroupe les six genres inter-fertiles des agrumes : *Poncirus*, *Fortunella*, *Citrus*, *Eromocitrus*, *Microcitrus* et *Clymenia* en un seul genre nommé *Citrus* (Mabberley, 1997).

Le progrès biotechnologique en termes d'outils d'analyse, de connaissances des génomes a d'ores et déjà fourni des réponses aux interrogations sur l'origine des espèces et des formes cultivées, la variabilité et la structure des populations et pourra ainsi apporter des éléments pour réviser la taxonomie des agrumes (Jacquemond *et al.*, 2013; Luro *et al.*, 2013; Penjor *et al.*, 2013 ; Curk *et al.*, 2015.).

En référence à la classification de (Swingle, 1967), on distingue huit principaux groupes taxonomiques : *C. medica* (L.) (cédratiers), *C. reticulata* Blanco (mandariniers), *C. maxima* (L.) Osb. (pamplemoussiers), *C. sinensis* (L.) Osb. (orangers), *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. (limettiers), *C. paradisi* Macf. (pomelos), *C. limon* (L.) Burm. F. (citronniers), *C. aurantium* (L.) (bigaradiers).

La diversité génétique au sein des agrumes se traduit par une variabilité des caractères morphologiques ou de couleur (Figure 3), organoleptiques mais aussi des résistances aux facteurs biotiques et abiotiques. En plus de cette variabilité agro-morphologique, les agrumes se caractérisent par une variabilité biochimique et moléculaire souvent utilisée pour étudier les relations phylogéniques entre les différentes espèces (Ollitrault *et al.*, 1999).

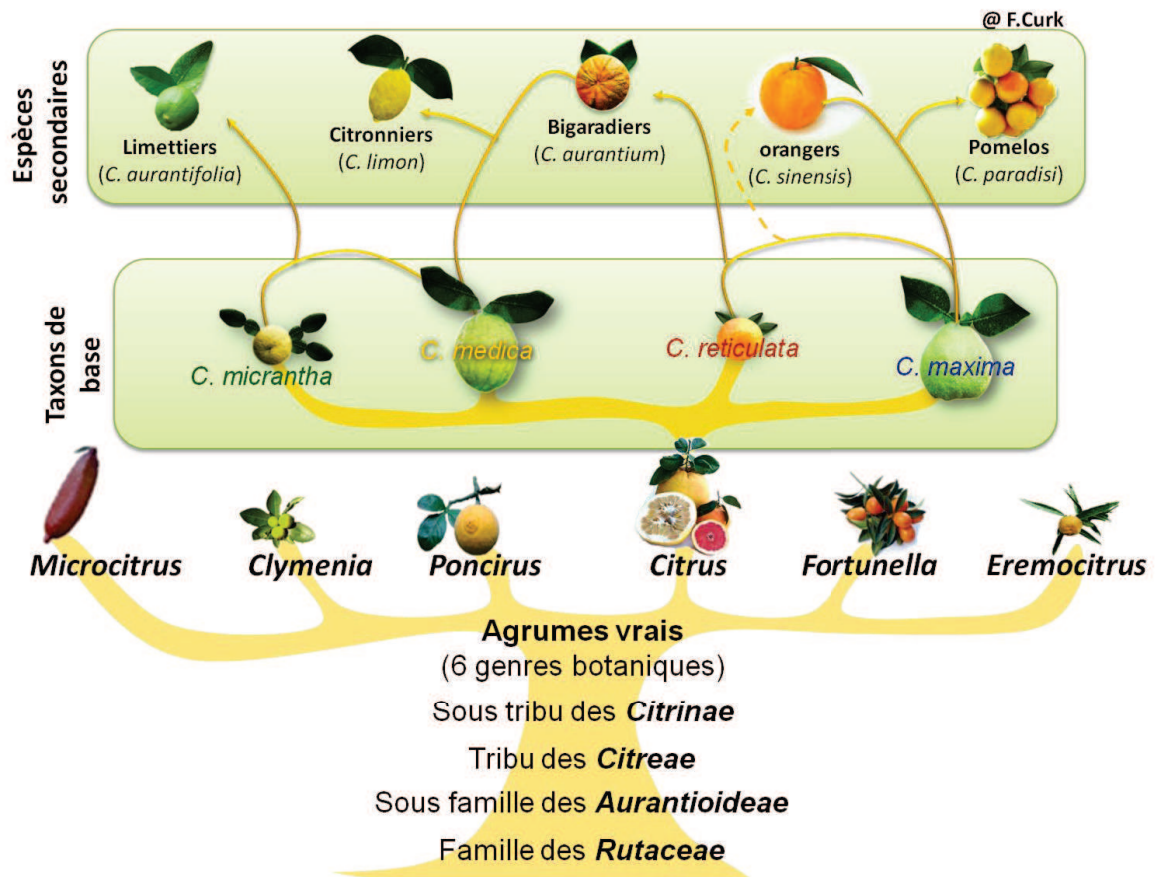


**Figure 3.** Diversité génétique au sein des agrumes

### ***1.3. Origine génétique et géographique des citrus cultivés***

La première étude qui a porté sur la phylogénie et l'origine des espèces est celle de (Barrett et Rhodes, 1976). Cette étude basée sur des marqueurs biochimiques et morphologiques suggère que la plupart des agrumes cultivés appartenant au genre *Citrus* serait issu de trois espèces vraies : *Citrus medica* L. (cédratier), *Citrus reticulata* Blanco (mandarinier), *Citrus maxima* L. Osbeck (pamplemoussier). Par la suite d'autres études ont été conduites à l'aide de différents outils: la diversité des caractères morphologiques (Ollitrault *et al.*, 2003), l'analyse des métabolites primaires (Luro *et al.*, 2011) et secondaires (Fanciullino *et al.*, 2006), l'utilisation des marqueurs moléculaires (Luro *et al.*, 2011; Ollitrault *et al.*, 2012; Curk *et al.*, 2014). Ces études convergent toutes vers l'existence de quatre taxons à l'origine des agrumes cultivées, qui sont aussi appelés espèces ancestrales. Aux trois premières citées s'ajoute en effet un papéda nommé *C. micrantha* Wester qui serait à l'origine du limettier (Nicolosi *et al.*, 2000). C'est

autour de ces quatre espèces de base que s'établit la structuration de la diversité des *Citrus* cultivés (Ollitrault *et al.*, 1999) (Figure 4).



**Figure 4.** Classification des agrumes et origine génétique des *Citrus* cultivés

Les divergences morphologiques et génétiques observées entre les trois taxons de base principaux *C. medica*, *C. reticulata*, *C. maxima* sont expliquées par leur origine géographique et leur évolution allopatrique. Ils se seraient diversifiés dans trois zones géographiques distinctes : les mandariniers dans une région qui couvre le Japon et la Chine du Sud, les pamplemoussiers dans l'archipel malais et les cédratiers dans le nord-est de l'Inde et dans des régions proches (Ollitrault et Luro, 1997). Ces espèces ont colonisé de nouveaux espaces dans des zones de convergence de leurs zones d'origine, pour générer par croisements des formes hybrides interspécifiques, puis se propager dans tout le sud-est asiatique, puis l'Asie subtropicale pour être propagées sur les autres continents au fur et à mesure des conquêtes, des migrations humaines et le développement des échanges commerciaux (Turk *et al.*, 2004). Ainsi, le cédratier fut la première espèce importée au bassin méditerranéen au III<sup>e</sup> siècle avant J-C.

Au fur et à mesure de la culture et de la diffusion des agrumes, les formes cultivées seraient apparues par recombinaison entre les taxons de base mis en contact au cours d'un long processus d'évolution (Barkley *et al.*, 2006). Ainsi *C. sinensis* qui proviendrait de deux hybridations interspécifiques entre pamplemoussier x mandarinier (Wu *et al.*, 2014) alors que *C. aurantium* serait un hybride de première génération entre un pamplemoussier et un mandarinier (Ollitrault *et al.*, 2012). Le pomelo résulterait d'un croisement naturel entre un oranger et un pamplemoussier (de Moraes *et al.*, 2007). Le citronnier découlerait d'une combinaison entre un cédratier et un bigaradier (Nicolosi *et al.*, 2000) (Figure 4). Le clémentinier serait issu d'un croisement entre un mandarinier et un oranger (Deng *et al.*, 1996 ; Ollitrault *et al.*, 2012).

Le croisement sexué a été le principal moteur de la diversification des taxons de base. La diversité varie d'une espèce à une autre. Les pamplemoussiers présentent une forte diversité qui est générée par l'auto incompatibilité gamétique (Ollitrault et Luro, 1997). Une telle particularité de reproduction favorise les croisements sexués et, par conséquent, le brassage génétique. Chez les mandariniers, bien que l'autofécondation soit possible, l'évolution a été essentiellement réalisée par des croisements inter-variétaux. Contrairement aux pamplemoussiers et aux mandariniers, les cédratiers se caractérisent par une faible diversité due à une évolution principalement basée sur l'autofécondation (Luro *et al.*, 2013).

Si la reproduction sexuée a été le principal mécanisme de diversification des espèces ancestrales, les mutations ont été le moteur de celle des taxons cultivés ou espèces secondaires. Chez les agrumes, les mutations sont assez fréquentes (Frémont, 1935). Une mutation consiste à un changement spontané d'un ou de plusieurs gènes. Certaines mutations changent l'expression du gène qui peut se traduire par l'apparition d'un nouveau caractère telle que la coloration de la pulpe des fruits, l'absence de pépin... Les mutations intéressantes sont repérées et multipliées par greffage. La sélection humaine a donc pu conserver de nombreuses formes différentes issues des mutations (Luro *et al.*, 2013).

#### ***1.4. Classification des orangers et des mandariniers***

En raison de sa grande diversité génétique, différentes classifications ont été établies au sein du groupe des mandariniers. Tandis que Webber (1943) classe les mandariniers en quatre groupes : King, Satsuma, Mandarine et Tangerine. Tanaka (1954) élève le nombre de groupes taxonomiques à cinq. Sa classification a été basée sur la typicité et l'importance économique des espèces. Plus tard Hodgson (1967) reprend la classification de Tanaka et classe les mandariniers d'importance économique en quatre groupes : *C. unshiu* ('Satsuma'), *C.*

*reticulata* Blanco ('Ponkan', 'Dancy', 'Clémentine'), *C. deliciosa* Tenore ('Willowleaf') et *C. nobilis* Loureiro ('King'). La même année, Swingle et Reece (1967) ont regroupé tous les mandariniers en une seule espèce, *C. reticulata* Blanco. Il est à noter que le clémentinier élevé au rang d'espèce par Tanaka, (*C. clementina*) s'insère dans le groupe des mandariniers.



**Figure 5.** Photographie de mandarines illustrant une part de la diversité de ce groupe

Les oranges douces, (*C. sinensis*), sont subdivisées en trois catégories principales communément dénommées: oranges navels, oranges blondes et oranges sanguines. Les oranges navels sont connues pour leur excroissance « Navel » (ou nombril) située dans leur partie supérieure du fruit (l'opposé à l'attache pédonculaire) et une quasi absence de pépins. Elles se caractérisent aussi par leur faible jutosité. Plusieurs variétés font partie de ce groupe, telles que Washington navel, Navelina, Navelate... Il s'agit du groupe le plus commercialisé sur le marché international pour les fruits frais. Le groupe des oranges blondes contient les variétés Valencia late, Shamouti, Hamlin, Salustiana... Quant au groupe des oranges sanguines, il est composé de variétés dont la chair est colorée grâce à des pigments rouges, des anthocyanes: Moro, Sanguinelli, Maltaise... Il existe également une dernière catégorie, mineure, des oranges faiblement acides nommées oranges douceâtres: Sucrena, Iaffaoui douce ... (Krezdorn, 1970; Ollitrault et Navarro, 2012).

### **1.5. Progrès génétiques : Réalisations, atouts et contraintes**

L'agrumiculture se base sur l'association de deux variétés : l'une formant le porte-greffe et l'autre formant le greffon. Les porte-greffes sont sélectionnés pour leur adaptation et leur meilleure tolérance aux contraintes biotiques et abiotiques. Par ailleurs les variétés doivent être productives et les fruits de bonne qualité (Praloran, 1971). Le développement de la culture des agrumes repose sur la création de nouveaux porte-greffes et de nouvelles variétés ayant la majorité des critères recherchés (Luro *et al.*, 2013). L'amélioration génétique s'appuie sur les connaissances des diversités phénotypiques, des mécanismes reproductifs et de la diversité génétique (Ollitrault et Luro, 1997). En effet, c'est via l'exploitation des ressources génétiques que l'amélioration pourra sélectionner les variétés les plus propices à répondre aux attentes des agrumiculteurs pour faire face aux contraintes biotiques et abiotiques et à celles des consommateurs.

Les voies classiques pour l'amélioration variétale, basées sur le croisement sexué et l'obtention d'une descendance d'hybrides se heurtent à certaines caractéristiques de la biologie de la reproduction des agrumes : la polyembryonie, la juvénilité, l'hétérozygotie, l'auto-incompatibilité gamétophytique, les stérilités, la place occupée par les arbres... (Frost et Soost, 1968; Ollitrault et Luro, 1997).

- L'apomixie ou la reproduction asexuée : elle est fréquente chez les agrumes et se manifeste par le développement d'embryons surnuméraires à celui du zygote, par divisions mitotiques de cellules du nucelle. Ces embryons nucellaires ne se développent que si la fécondation a eu lieu (donc c'est une apomixie partielle). Ils entrent en compétition pour le développement de jeunes plantules car au maximum 3 (rarement 4) peuvent croître à partir de chaque graine. Le nombre d'embryon par graine (polyembryonie) est variable selon les génotypes et laisse plus de chance à l'embryon zygotique de se développer en plante, quand il est faible ( $< 2$ ) (Ollitrault et Luro, 1997). Cette apomixie est présente chez la plupart des espèces cultivées et certaines espèces fondamentales (*C. reticulata*, *papedas* sp. *Fortunella* sp. et *Poncirus trifoliata*). Elle est en revanche inexistante chez *C. maxima* et *C. medica*. Bien qu'utile pour la multiplication clonale (elle est exploitée pour la propagation des porte-greffes) l'apomixie est, en revanche, un obstacle pour l'obtention de descendants à partir de parents maternels apomictiques (Ollitrault et Luro, 1997). Par ailleurs, cette apomixie permettrait de fixer à la longue, dans les génomes, des mutations délétères ou néfastes,



maintenues à l'état récessif (Ollitrault *et al.*, 1994). Cela entraîne une dépression de consanguinité dans les descendance d'autofécondation ou de croisements entre génotypes apparentés.

- La phase juvénile : elle correspond à une phase de croissance végétative de la plante issue du développement embryonnaire qui ne produit pas de fleurs (sexuellement immature) et qui s'étale sur plusieurs années. La durée varie selon les variétés et selon les conditions environnementales (Frost et Soost, 1968). Dans les zones favorables à une croissance rapide des arbres, cette juvénilité peut ne pas dépasser 3 années alors que dans les conditions de la Corse en moyenne elle dure de 6 à 8 ans (Jacquemond et Agostini, 2013). Certaines variétés, comme le Calamondin, ont une floraison très précoce (2 ans). Il existe des méthodes horticoles pour forcer la réduction de la phase juvénile : (1) des croissances tuteurées sur un axe, suivies d'arcs des extrémités ; (2) l'utilisation de porte-greffes accélérant la mise à fleur ; (3) l'association contrôlée d'un stress hydrique et d'un stress froid, etc.... On peut citer aussi à ce titre les travaux de transgénèse des gènes *Leafy* et *Apetala*, réalisés sur citrange Carrizo et qui ont conduit à l'obtention d'une descendance à floraison induite très précocement (moins de 12 mois) (Peña *et al.*, 2001). Hormis dans cet exemple d'OGM, les schémas de sélection récurrente sur plusieurs générations sont difficilement concevables chez les agrumes.
- L'hétérozygotie: la plupart des espèces cultivées étant des hybrides interspécifiques de première ou de deuxième génération, leur degré d'hétérozygotie est très élevé (Ollitrault *et al.*, 1999). Cette hétérozygotie s'oppose donc à la fixation des caractères des génotypes homozygotes et engendre donc dans la descendance de première génération, une très forte diversité génotypique et donc phénotypique. La taille des populations à étudier en amélioration doit donc être très fortement augmentée afin de tenir compte de cette diversité. Cette caractéristique reproductive augmente la variabilité des combinaisons génétiques (Luro *et al.*, 2013)
- L'auto incompatibilité gamétophytique: *C. maxima* est la seule espèce touchée par cette caractéristique reproductive qui empêche l'autofécondation. L'auto-incompatibilité se retrouve également chez plusieurs hybrides de pamplemoussier tels que les tangélos Orlando et Minneola... (De Rocca Serra et Ollitrault, 1992) et chez quelques variétés cultivées appartenant au groupe de mandarines et présentant un lien de parenté avec le pamplemoussier telles le clémentinier et le mandarinier Fortune. Cette caractéristique de la reproduction ne permet donc pas de générer des populations

d'autofécondation et limite l'obtention de certains génotypes aux locus liés à l'auto incompatibilité gamétophytique.

- La stérilité gamétique: Elle peut toucher les organes reproductifs mâles ou femelles. Elle est très souvent présente à des degrés variables. La stérilité pollinique peut être partielle comme pour le pomelo Marsh ou totale comme pour l'oranger Washington navel. La stérilité est rencontrée chez le mandarinier Satsuma, le pomelo Marsh... (Ollitrault et Luro, 1997). Elle est généralement due à l'altération de l'évolution des tissus gamétiques et pas à une absence d'organes reproducteurs comme c'est le cas dans la stérilité mâle. La stérilité gamétique peut être d'ordre génétique ou physiologique (De Rocca et Ollitrault, 1992).

Les aspects positifs de la biologie des agrumes pour l'amélioration au sens large regroupent un génome d'une petite taille ( $\approx 300$  Mb) (Wu *et al.*, 2014), une diversité génétique naturelle considérable, une propagation asexuée simple par greffage ou bouturage, la diploïdie de la plupart des espèces, un réservoir naturel riche en mutations.

Compte tenu de ces contraintes liées à la reproduction et à la croissance, les sélectionneurs ont souvent eu recours à la sélection clonale de mutants, qui sont pour la plupart, d'apparition spontanée. Les mutations sont des modifications spontanées des gènes. Grâce à ce phénomène très fréquent, les agrumes se sont diversifiés au fil du temps. De nouveaux caractères morphologiques et physiologiques sont apparus (Roose et Close, 2008). C'est le cas par exemple de beaucoup de variétés d'orangers, de clémentiniers, de pomelos, de citronniers pour lesquels l'homme n'a fait que sélectionner les nouvelles formes qu'il découvrait dans les vergers. Cependant, depuis les années 50, des travaux de mutagenèse par irradiation aux rayons gamma ont permis de produire de nouvelles variétés mutantes qui, pour la plupart, étaient des formes stériles (donc fruits aspermes) de génotypes fertiles. L'exemple le plus connu est celui du pomélo Star Ruby produit en 1954 et commercialisé dans les années 70 (Hensz, 1971; Hensz, 1977).

De nombreuses hybridations sexuées ont cependant été réalisées pour l'innovation variétale telles que les tangors (mandarinier  $\times$  oranger) ou les tangélos (mandarinier  $\times$  pomélos). Les variétés les plus cultivées sont le plus souvent des hybrides spontanés nés du hasard des pollinisations naturelles : le clémentinier, les mandariniers Murcott, Ortanique et Afourer. La fécondation pour l'obtention de porte-greffe semble moins problématique que pour celle des variétés car plusieurs hybrides inter-génériques obtenus par les sélectionneurs

sont aujourd'hui très utilisés en agrumiculture: les citranges (Troyer, Carrizo) hybrides d'oranger et de Poncirus, les citrumélos (C35, 4475, Sacaton,...) hybrides de pomélos et de Poncirus, les citrandarins (Forner, Flhor AG1...) hybride de mandarinier et de Poncirus. Cela tiendrait au fait que les caractères recherchés pour les porte-greffes seraient peut-être de contrôle génétique plus simple et leurs phénotypes seraient plus faciles à tester que ceux liés aux caractères organoleptiques et morpho-chimiques des fruits. Les tolérances aux facteurs biotiques et abiotiques, de même que la vigueur, peuvent être éprouvées précocement au stade pépinière évitant ainsi la contrainte de la phase juvénile. Néanmoins la compatibilité des associations du greffage ainsi que la qualité induite par le porte-greffe à la production du greffon nécessitent du temps et impliquent la mise en place d'essais lourds et coûteux (Jacquemond *et al.*, 2013).

De manière générale pour l'amélioration des cultivars et des porte-greffes, il est indispensable de s'affranchir de ces contraintes de la biologie des agrumes. Dans de nombreux pays l'amélioration variétale des petits fruits de type mandarine fait appel, depuis le début des années 90, à l'obtention de triploïdes par hybridation. Ce niveau de ploïdie confère en effet l'aspermie des fruits (stérilité). L'obtention de triploïdes s'opère de deux manières différentes, soit par apparition spontanée dans des croisements entre génotypes diploïdes soit par croisements entre un parent tétraploïde et un parent diploïde. Dans le premier cas ils résultent d'une fécondation entre un gamète normal à  $n = 9$  chromosomes et d'un gamète non réduit ( $2n = 18$  chromosomes) issu d'une méiose imparfaite (Luro *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2008). Ces techniques d'obtention de type triploïdes font appel aux biotechnologies (sauvetage d'embryon *in vitro*, haploïdisation par gynogenèse induite, cytométrie en flux, hybridation somatique par fusion de protoplastes, etc (Ollitrault *et al.*, 2008)).

Le développement des marqueurs moléculaires est en constante évolution depuis au moins deux décennies. Les premiers marqueurs utilisés chez les agrumes étaient les isoenzymes à la fin des années 1970 (Torres *et al.*, 1978). Ils ont été suivis par les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) et les RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pendant les années 1980s et au début des années 1990s et plus récemment AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), et ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) et d'autres types de marqueurs (Fang et Roose, 1997; Sankar et Moore, 2001 ; Ahmad *et al.*, 2003; Barkley *et al.*, 2006; Pang *et al.*, 2007 ; Chen *et al.*, 2008). Ces marqueurs ont été utilisés entre autres pour

l'étude de l'origine des plantes, la caractérisation variétale et l'étude de caractères d'intérêt. (Ollitrault et Luro, 1997 ; Curk *et al.*, 2015)

### **1.6. Etude génétique des caractères quantitatifs**

Pour augmenter l'efficacité des programmes d'amélioration, il est nécessaire de construire des cartes génétiques permettant l'association des marqueurs à des caractères d'intérêt ou à des gènes. Cette approche facilite la manipulation de la variabilité génétique pour construire des génotypes intéressants (Durham *et al.*, 1992).

#### **1.6.1. Génome des agrumes**

Les agrumes sont des espèces diploïdes avec  $n=9$  chromosomes (Krug CA, 1943). Bien que ces espèces ont le même nombre de chromosomes, la taille de leur génome haploïde n'est pas la même. En effet, elle varie de 360 Mb chez le *C. reticulata* à 398 Mb chez le *C. medica*. Les espèces secondaires tels que l'oranger et le bigaradier possèdent une taille de génome intermédiaire (Ollitrault *et al.*, 2003). De part de la relation phylogénétique entre les espèces primaires et secondaires, le génome des espèces secondaires se constitue d'une mosaïque de fragments d'ADN hérités des espèces parentales notamment les pamplemoussiers et les mandariniers. Les espèces cultivées se caractérisent donc par une forte hétérozygotie (Garcia-Lor *et al.*, 2012).

Le génome du clémentinier est le premier génome séquencé chez les agrumes (Luro *et al.*, 2013). C'est ainsi qu'il est devenu le génome de référence pour tous les autres agrumes. Sa taille est égale à 367 Mb. Le séquençage a été effectué entre 2008 et 2010 par le consortium international ICGC (International Citrus Genome Consortium) dans plusieurs laboratoires internationaux (Wu *et al.*, 2014). D'autres génomes d'agrumes ont été entièrement séquencés tels le *C. sinensis* (Xu *et al.*, 2013), des mandariniers et des hybrides (Shimizu *et al.*, 2012).

Le décryptage du génome permettrait le développement de la sélection assistée par marqueur. Grâce au séquençage, un très grand nombre de marqueurs ont pu être développés et une carte physique ainsi que des cartes génétiques de l'oranger, du clémentinier, du pamplemoussier... ont été construites (Ollitrault *et al.*, 2012).

#### **1.6.2. Cartes génétiques**

Jusqu'à maintenant, plusieurs cartes génétiques de groupe de liaison entre marqueurs («linkage mapping») ont été publiées chez les agrumes (Luro *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2008; Gulsen

*et al.*, 2010; Ollitrault *et al.*, 2012). La plupart des cartes ont été réalisées à partir de croisements entre *Citrus x Poncirus* afin d'augmenter le niveau d'hétérozygotie et faciliter l'obtention de marqueurs. En revanche, ce genre de croisement ne permet pas d'étudier les caractères d'intérêt agronomique liés au fruit car les fruits des hybrides obtenus ne sont que rarement comestibles. En outre, la plupart de ces cartes sont incomplètes en raison du faible nombre de marqueurs utilisés. Il en résulte que le nombre de groupes de liaison est souvent différent du nombre de chromosomes. Afin de disposer de cartes plus complètes, il serait nécessaire d'augmenter le nombre des marqueurs permettant ainsi de couvrir plus finement l'ensemble du génome. En 2012, Ollitrault *et al.* (2012) ont publié la première carte de référence des agrumes. Des cartes denses permettent de faire des analyses fines de QTL (Quantitative Trait Loci) (Roose et Close, 2008). Quelques analyses de QTL ont permis de localiser des régions chromosomiques contrôlant la tolérance à la salinité (Tozlu *et al.*, 1999), la résistance à la Tristeza (Asins *et al.*, 2004), la résistance à l'*Alternaria* Brown Spot (Dalkilic *et al.*, 2005), le nombre de pépins et le rendement (Garcia *et al.*, 2000) et les caroténoïdes (Sugiyama *et al.*, 2011). Cependant, malgré ces travaux, des analyses fines de QTL sur la qualité des fruits n'ont toujours pas été réalisées (Roose et Close, 2008).

### **1.6.3. Analyse QTL**

#### **1.6.3.1. Principe et intérêt d'une analyse QTL**

De nombreux caractères d'intérêt agronomique manifestent une variation continue dans les populations. Cette variation résulte de l'action de plusieurs gènes auxquels peuvent s'ajouter les effets de l'environnement. Il s'agit de caractères quantitatifs polygéniques (Collard *et al.*, 2005). Les locus impliqués dans la variation des caractères quantitatifs sont appelés QTL (Quantitative Trait Locus) (Geldermann, 1975). Ils sont caractérisés par leur effet sur le caractère cible et leur position sur le génome. La cartographie de QTL est fondée sur la recherche systématique de déséquilibre de liaison entre locus marqueurs et locus contrôlant les caractères quantitatifs (Ytounel *et al.*, 2008).

Outre la cartographie génétique des caractères quantitatifs, l'analyse QTL permet de déterminer l'effet positif ou négatif des allèles intervenant dans un phénotype donné. Elle permet également la dissection des interactions génotype/environnement et l'évaluation de l'héritabilité des caractères étudiés ainsi que la variance phénotypique expliquée par les QTL (Michelmore, 2000).

### **1.6.3.2. Outils et étapes d'une analyse QTL**

Pour identifier les QTL, il est nécessaire d'avoir une descendance en ségrégation dont les individus sont issus d'un croisement obtenu par reproduction sexuée. Différents types de descendance peuvent être utilisés telle qu'une descendance F<sub>2</sub>, des populations de lignées recombinantes, des lignées d'haploïdes doublées, des populations issues d'un backcross etc... (Staub *et al.*, 1996). Le choix des parents s'effectue généralement sur deux individus présentant un polymorphisme pour les caractères à étudier afin d'obtenir de la variabilité au sein de la descendance et d'induire ainsi une forte puissance de détection des QTL grâce à un fort déséquilibre de liaison (Collard *et al.*, 2005). La diversité au sein de la population fille résulte de la ségrégation aléatoire et indépendante des chromosomes et des possibilités de recombinaison génétique entre les chromosomes homologues au cours de la méiose. L'analyse statistique des résultats issus de la population permet de déterminer les fréquences de recombinaison et, par conséquent, les distances génétiques entre les gènes (Samouelian et Gaudin, 2009). Le nombre d'individus de la population varie généralement de 50 à 250. Plus le nombre d'individus est important, plus l'ordre des marqueurs moléculaires et la distance génétique entre les marqueurs sont précis (Collard *et al.*, 2005).

La détection des QTL se fait en plusieurs étapes notamment la construction de la carte génétique, le phénotypage de la population et la mise en lien des données de phénotypage et de celles de génotypage (de Vienne, 1998).

#### **1.6.3.2.1. Etablissement d'une carte génétique**

La carte génétique est l'assemblage des marqueurs moléculaires en groupes de liaison et l'ordonnement de ces marqueurs les uns par rapport aux autres grâce à l'analyse statistique de leur ségrégation au cours de la méiose. La position des marqueurs et la distance qui les sépare sont déterminées via le calcul de leur fréquence de recombinaison. La distance génétique entre deux marqueurs est mesurée en centimorgan (cM) (de Vienne, 1998). Elle est proportionnelle à la probabilité qu'un événement de recombinaison dû à un crossing-over se produise entre ces marqueurs lors de la méiose. Plus la probabilité de recombinaison entre deux marqueurs est élevée, plus la distance entre ceux-ci est grande (Collard *et al.*, 2005). Un nombre suffisant de marqueurs doit être utilisé pour pouvoir saturer le génome afin d'avoir autant de groupes de liaison que de chromosomes. Plus une carte génétique est dense en marqueurs, plus la localisation des QTL détectés et l'identification de leurs effets sont précises. En revanche, un nombre très élevé de marqueurs peut induire des erreurs dans l'ordre des marqueurs et l'estimation de la distance génétique (de Vienne, 1998). L'utilisation des marqueurs polymorphes est indispensable afin de pouvoir suivre leur ségrégation au sein

de la population (Samouelian et Gaudin, 2009). La construction d'une carte génétique se fait en quatre étapes qui sont les suivantes: choisir la population, calculer la fréquence de recombinaison, former les groupes de liaison et estimer la distance génétique entre les marqueurs et enfin ordonner les marqueurs (Staub *et al.*, 1996). Plusieurs logiciels informatiques tels que GMendel (Echt *et al.*, 1992), Mapmaker (Lander *et al.*, 1987) et JoinMap (Stam, 1993) ont été développés pour faciliter la construction des cartes génétiques. La carte génétique est caractérisée par sa saturation, sa longueur, la densité et la répartition des marqueurs ainsi que la grandeur moyenne de l'unité de distance qui sépare les marqueurs (Samouelian et Gaudin, 2009).

#### **1.6.3.2.2. Phénotypage**

L'évaluation phénotypique des caractères d'intérêt représente une des étapes clés dans la réalisation de l'analyse de QTL (de Vienne, 1998). A l'instar des marqueurs moléculaires, un phénotype n'a d'intérêt que s'il est variable au sein de la population étudiée. La variabilité est ainsi un critère primordial pour l'analyse de QTL. La détection de QTL ne dépend pas seulement de la variabilité du caractère mais aussi de la précision du phénotypage. La qualité de phénotypage influence directement la pertinence de la détection des QTL en aval. Ainsi, l'utilisation des méthodes d'évaluation phénotypique justes, précises et reproductibles est indispensable (Li *et al.*, 2006). Le nombre de répétitions à l'intérieur d'une même expérience ou le nombre d'expériences indépendantes à effectuer dépend énormément de la nature du caractère et de son héritabilité. L'héritabilité est la part de la variation du caractère due à la variabilité génétique et non à l'environnement. Un caractère à faible héritabilité nécessite plus de mesures indépendantes qu'un caractère à forte héritabilité (Morot-Gaudry et Briat, 2004).

#### **1.6.3.2.3. Cartographie de QTL**

La recherche de QTL se fait par la mise en relation de la ségrégation des marqueurs moléculaires avec la variabilité du caractère grâce aux outils statistiques. Les méthodes de détection d'un QTL putatif à partir de l'information sur les phénotypes d'un caractère quantitatif testent l'hypothèse qu'il n'y a pas de QTL lié à une position du génome (hypothèse nulle, H0) contre celle de l'existence d'un tel QTL affectant ce caractère (hypothèse alternative, H1). Il existe principalement deux méthodes de biométrie pour effectuer cette recherche de corrélation: les méthodes de cartographie d'intervalle telles que la méthode d'*Interval Mapping* (IM) et les méthodes multimarqueurs telles que la méthode de *Composite Intervall Mapping* (CIM) (de Vienne, 1998). L'IM permet de tester de façon linéaire la présence de QTL au niveau d'intervalles entre les marqueurs (Lander et Botstein, 1989). La principale limite de la cartographie d'intervalle est qu'elle ne permet pas de détecter avec précision des

QTL proches sur le même chromosome. Les méthodes multimarqueurs (CIM) prennent en compte comme cofacteurs des marqueurs présentant des effets significatifs (Zeng, 1994). Les méthodes avec cofacteurs apportent plus de précision au niveau de l'estimation des effets et des positions des QTL. Ces méthodes permettent aussi de détecter les QTL proches situés sur un même chromosome contrairement à la méthode d'IM. Le nombre de QTL détectés par ces méthodes CIM est plus important que celui de QTL détectés par IM (Collard *et al.*, 2005).

### ***1.6.3.3. Facteurs influençant la détection des QTL***

Plusieurs paramètres influencent les résultats de détection de QTL. On note l'effectif de la population et la densité de marqueurs, les effets des QTL détectés, l'effet de l'environnement... Seuls les QTL à effet important et suffisant peuvent être détectés. Au contraire les QTL à effet faible peuvent ne pas être identifiés. L'environnement peut avoir une incidence très importante sur l'expression des QTL. Certains QTL détectés dans un milieu ne le sont plus dans un autre (Paterson *et al.*, 1991 ; Hayes *et al.*, 1993). Cette influence diffère selon la taille de la descendance, la gamme du milieu choisi et le caractère. Il est à noter que les caractères à forte héritabilité sont moins influencés par l'environnement que les caractères à faible héritabilité (de Vienne, 1998).

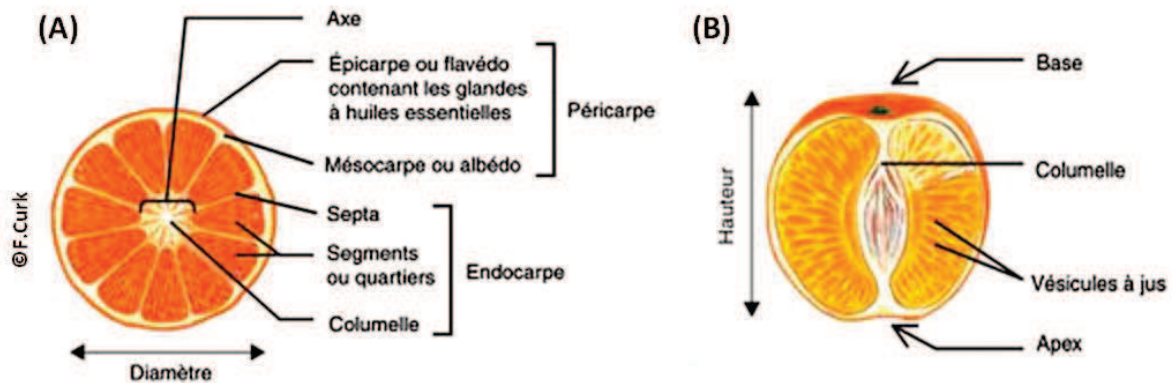
Le paramètre le plus important est l'effectif de la population. Plus l'effectif de la population est grand, plus le pouvoir statistique de détection du QTL augmente. La précision de l'estimation de l'effet de QTL et de l'intervalle de confiance augmente aussi avec l'augmentation de la taille de la population (Beavis, 1998). Dans des populations à grand effectif, les QTL à effet mineurs peuvent être détectés (Haley et Andersson, 1997).

## ***2. Maturation des fruits des agrumes***

### ***2.1. Morphologie et anatomie du fruit***

Tous les fruits des agrumes ont la même structure. Seuls la dimension et la forme changent d'une espèce à une autre. Il s'agit d'un point de vue biologique d'une baie charnue (Figure 6). Le fruit est composé de deux parties: la peau également appelée péricarpe et la pulpe appelée aussi endocarpe. Le péricarpe est composé d'un épicarpe qui correspond au flavedo et d'un mésocarpe qui correspond à l'albedo (Ladanyia, 2008). Le flavedo représente la partie externe colorée (vert, jaune, orange...) contenant les glandes à huiles essentielles. L'albedo quant-à-lui représente la partie interne de la peau composée de tissus spongieux de couleur blanchâtre. Au milieu de l'endocarpe se trouve l'axe central du fruit (columelle) qui est entouré par les segments. Ces derniers sont composés de vésicules à jus nommés aussi sacs à jus (Salunkhe et Kadam, 1995 ; Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996 ; Ladanyia, 2008).





**Figure 6.** Coupes transversale (A) et longitudinale (B) schématisques d'une clémentine

## 2.2. Etapes de croissance et développement du fruit

Un fruit d'agrumes mûr est le produit final d'un ensemble d'événements qui commencent par la formation des structures reproductives: bourgeons, fleurs, petits fruits et finit par la formation des fruits mûrs. Ces événements s'étalent sur une période allant de six à douze mois en fonction du climat (Sinha *et al.*, 2012). La croissance des agrumes suit une courbe sigmoïdale comportant trois phases de développement: une phase de division cellulaire, une phase de différenciation et de croissance cellulaire et une phase de maturation (Bain, 1958) (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996 ; Iglesias *et al.*, 2007).

### 2.2.1. Phase de division cellulaire

La phase de division cellulaire se caractérise par une lente croissance du volume du fruit et par une division cellulaire très intense. Cette division cellulaire se produit seulement au niveau des couches supérieures du flavédo et dans les vésicules à jus (Wardowski *et al.*, 1986 ; Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996). A la fin de cette période, l'épaisseur de la peau du fruit atteint son maximum. A ce stade l'albédo représente 60 à 90% du volume du fruit (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996). Cette première phase dure environ huit semaines (Agusti, 2000).

### 2.2.2. Phase de différenciation cellulaire

La deuxième phase du développement du fruit est marquée par une croissance rapide due à l'élargissement cellulaire. Les cellules des segments de la pulpe s'élargissent. Le flavédo du fruit devient plus épais et l'albédo se transforme en un tissu spongieux. Ce tissu spongieux se développe également au niveau de l'axe central du fruit. A ce stade, l'augmentation du volume du fruit est due essentiellement à la croissance des segments de la

pulpe (Wardowski *et al.*, 1986 ; Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996). A ces changements morphologiques s'ajoutent des changements biochimiques. On assiste à une accumulation importante des sucres solubles et des acides organiques. Au milieu de cette phase, l'acidité atteint une concentration maximale. Puis, une fois le maximum atteint, l'acidité commence à diminuer (Iglesias *et al.*, 2007). La phase de différenciation cellulaire dure trois à six mois (Figure 7) (Sinha *et al.*, 2012).

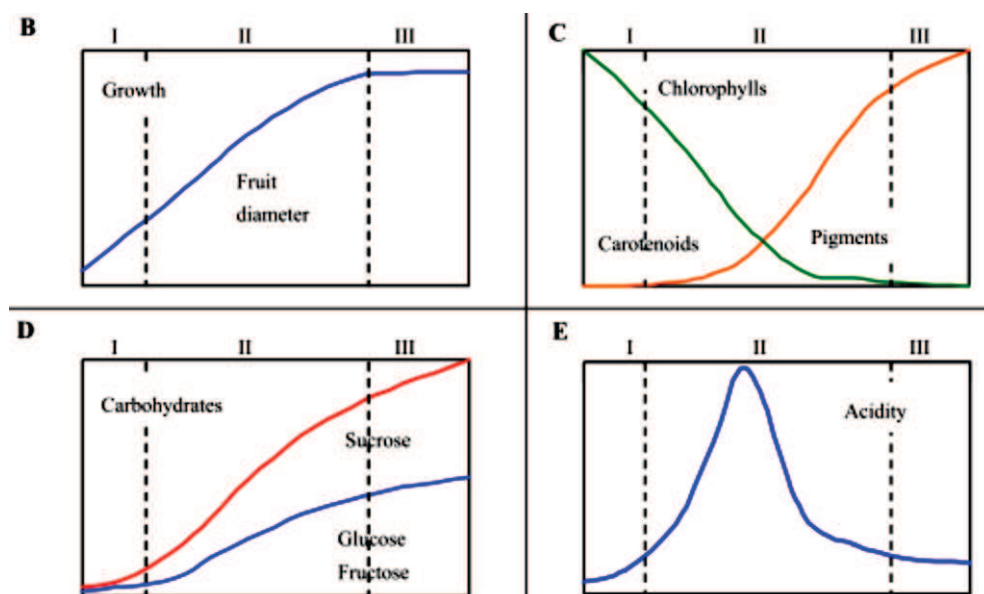
### 2.2.3. Phase de maturation

Pendant cette dernière phase, les changements biochimiques continuent mais de manière moins importante que dans la phase précédente (Sinha *et al.*, 2012). Dans le bassin méditerranéen et d'autres zones de culture, la phase de maturation se manifeste entre autre par la dégradation de la chlorophylle du péricarpe et la synthèse des caroténoïdes. Le fruit vire vers sa couleur variétale typique (Figure 4) (Prinsloo, 2007; Sinha *et al.*, 2012).

## 2.3. Changements physiologiques et biochimiques au cours de la maturation

### 2.3.1. Caractérisation de la maturation

La maturation des fruits correspond à un ensemble de changements biochimiques et physiologiques qui conduisent le fruit à son état de maturité physiologique, ou commerciale quand il s'agit de variétés cultivées, et qui lui confère ses caractéristiques organoleptiques sensorielles: arômes, goût, couleur, jutosité... (Kader, 1997 ; Iglesias *et al.*, 2007).



**Figure 7.** Courbes des changements morphologiques et biochimiques au cours de la maturation (Iglesias *et al.*, 2007); les chiffres I, II et III correspondent aux trois phases de développement du fruit

Les agrumes sont des fruits non-climactériques. Ils se récoltent à maturité lorsque leurs qualités organoleptiques sont les plus proches des standards de consommation de chaque variété. En effet leur goût ne s'affine pas après la cueillette, bien au contraire. Ils ne manifestent pas de crise respiratoire ni de synthèse intense d'éthylène induisant un processus de mûrissement après récolte (Sinha *et al.*, 2012). Chez les oranges et les mandarines, la maturation se caractérise par la diminution de l'acidité initiée en phase II, l'augmentation des extraits solubles, l'acquisition d'une couleur variétale typique, la diminution de la fermeté (Figure 7)... Au cours de ces modifications morphologiques et biochimiques, on peut noter que l'accumulation des sucres et la diminution de l'acide citrique sont les changements biochimiques majeurs qui permettent de caractériser la maturation des fruits d'agrumes (Ladanyia, 2008)

### **2.3.2. Les sucres chez les fruits des agrumes**

#### **2.3.2.1. Composition du fruit en sucres**

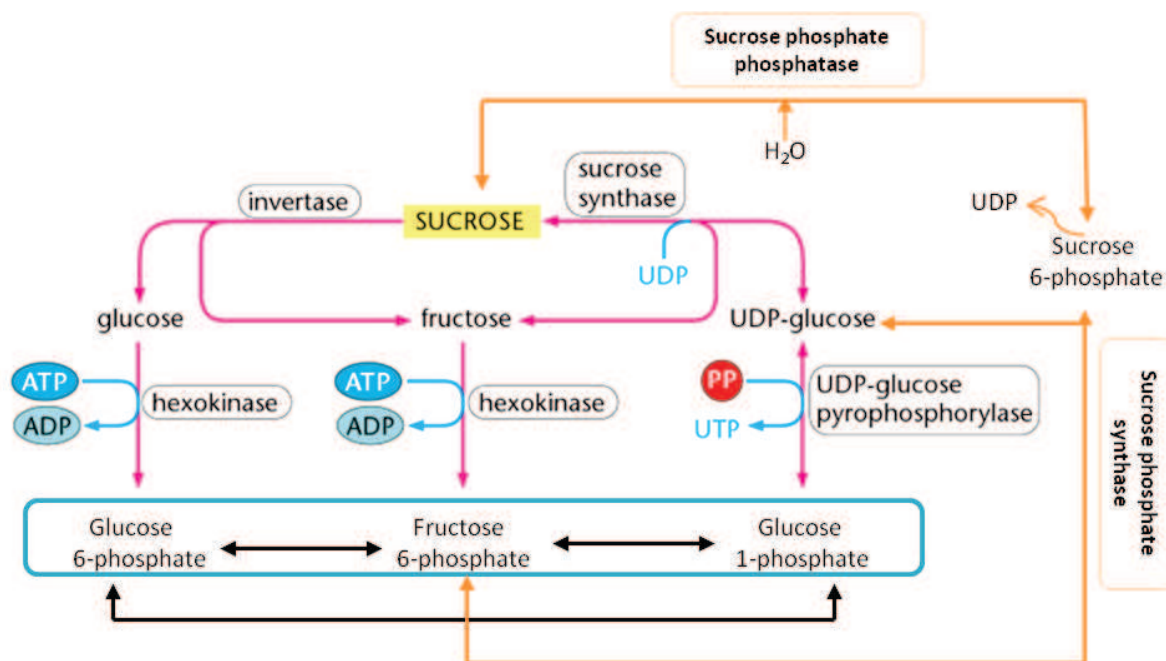
Les sucres représentent 75 à 85% des TSS (Teneur en sucres solubles) contenus dans le jus d'orange. Les sucres solubles sont principalement le glucose, le fructose et le saccharose (Ladanyia, 2008). Les teneurs de chaque sucre varient selon les espèces et les stades de développement du fruit. En effet chez les oranges et les mandarines, les pourcentages de glucose, de fructose et de saccharose varient respectivement de 1 à 2.3%, de 1 à 2.8% et de 2 à 6%. Chez le pomelo, le pourcentage de saccharose est moins important que celui des oranges et des mandarines. En fait, les sucres réducteurs (glucose et fructose) varient de 2 à 5% quant au pourcentage de saccharose, reste pratiquement constant aux alentours de 2 à 3% (Hui *et al.*, 2008). Les teneurs en sucres sont encore beaucoup plus faibles chez la lime et le citron. Chez ces deux agrumes, le pourcentage de glucose et de fructose est de l'ordre de 0.8% et le pourcentage de saccharose varie entre 0.2% et 0.3% (Ting et Attaway, 1971). En plus du glucose, du fructose et du saccharose, le jus d'agrumes contient d'autres sucres mais en plus faibles quantités tels que le mannose et le galactose (Davies et Albrigo, 1994).

Au cours de la maturation des fruits, le pourcentage des sucres, surtout celui de saccharose, augmente progressivement et régulièrement chez la plupart des espèces d'agrumes (Koch *et al.*, 1986) à l'exception des espèces dont les fruits sont acides telles que les limes et les citrons (Ladanyia, 2008). Il est à signaler que l'accumulation des sucres ne se produit pas uniquement au niveau des vésicules à jus mais aussi au niveau du flavédo (Ladanyia, 2008). Les fruits d'agrumes contiennent également de l'amidon qui est présent en petites quantités.

La concentration de ce polysaccharide continue à augmenter au cours de la croissance et de la maturation du fruit (Sinha *et al.*, 2012).

### 2.3.2.2. Métabolisme et transport des sucres

A l'origine, les sucres sont synthétisés à partir du saccharose qui lui-même est synthétisé via la photosynthèse au niveau du cytosol des cellules des feuilles matures (Smith *et al.*, 2009). Ce disaccharide est synthétisé via deux voies de biosynthèse: une voie principale, composée de deux réactions successives, et une voie secondaire. Deux enzymes sont utilisées au cours de la première voie ; la saccharose 6-phosphate synthase et la saccharose phosphate phosphatase (Hopkins, 2003). Le saccharose synthétisé via la deuxième voie de biosynthèse est la résultante d'une combinaison des formes phosphorylées de glucose et de fructose. Ce processus consomme de l'énergie fournie par l'UTP (uridine triphosphate). L'UTP réagit avec le glucose-1-phosphate pour former l'UDPG (uridine diphosphate glucose). Sous l'action du saccharose phosphate synthase, le glucose contenu dans l'UDPG se combine avec le fructose-6-phosphate pour donner une molécule du saccharose et une molécule d'UDP. Cette réaction est réversible (Bean, 1960; Hopkins, 2003) (Figure 8).b

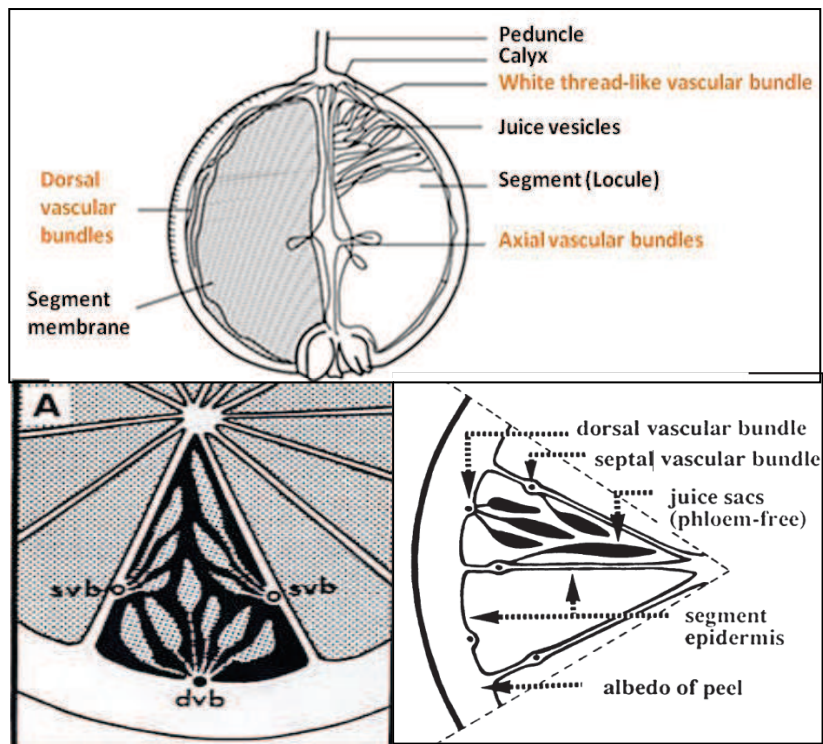


**Figure 8.** Réactions de synthèse et d'hydrolyse du saccharose.

ATP : Adénosine triphosphate ; ADP : Adénosine diphosphate ; UDP : Uridine diphosphate ; UTP : Uridine triphosphate ; PP : Pyrophosphate (Hopkins, 2003; Smith *et al.*, 2009).

Le saccharose formé au niveau des feuilles matures est ensuite transloqué vers les fruits et le reste des puits (les feuilles non matures, les branches, les racines...). Ce sucre est de loin le glucide le plus abondant dans les flux de métabolites (Hopkins, 2003). Le transport du saccharose de la source vers les autres organes dépend de « la force du puits » qui détermine la capacité de l'organe puits à attirer les photo-assimilats notamment le saccharose (Ho, 1988).

Par rapport à d'autres espèces, les agrumes présentent de faibles vitesses de translocation des photo-assimilats (Canny *et al.*, 1968). Plus on avance au cours de la maturation, plus la quantité des photo-assimilats transportée vers les fruits augmente. L'augmentation du flux de photo-assimilats est accompagnée par une augmentation du diamètre des tissus du phloème des feuilles vers le fruit, facilitant ainsi son transport (Koch et Avigne, 1990). Les photo-assimilats pénètrent dans les vésicules à jus via trois faisceaux localisés au niveau de l'épiderme de chaque segment. L'un des faisceaux est situé sur le côté dorsal de la paroi du segment alors que les deux autres faisceaux sont situés au niveau des septums latéraux de la paroi du segment (Figure 9) (Lowell *et al.*, 1989 ; Koch et Avigne, 1990) ont montré que la translocation des photo-assimilats à partir des vaisseaux jusqu'à l'extrémité avant des sacs à jus se fait via un système de transport non vasculaire étant donné qu'il n'y a pas de phloème dans les sacs à jus. Au cours de ce transport, une partie du saccharose est hydrolysée. Quand le saccharose arrive au niveau de l'épiderme du segment, il rentre lentement dans les cellules de stockage contenues dans les vésicules à jus. Il faut environ 24 heures pour que les photo-assimilats atteignent les extrémités des vaisseaux et 3 jours pour arriver aux extrémités des sacs à jus.



**Figure 9.** Localisation des trois faisceaux vasculaires au niveau de l'épiderme des segments de la pulpe des fruits des agrumes (Lowell *et al.*, 1989 ; Echeverria, 1996; Ladanyia et Ladaniya, 2010)

Sans clivage, les photo-assimilats transportés sous forme de saccharose se déplacent très lentement dans les cellules des vésicules du jus. Ainsi, le gain en carbone se produit selon un processus très lent qui s'étale sur une longue période au cours du développement du fruit. Les cellules formant les vésicules à jus représentent la destination finale du saccharose. Ces cellules possèdent des grandes vacuoles qui représentent les organes du stockage. Au niveau de ces vacuoles, on trouve le saccharose transporté des feuilles matures mais également le fructose et le glucose synthétisés à partir du saccharose (Echeverria, 1996; Prinsloo, 2007 ; Ladanyia, 2008). En effet, une fois arrivé dans la vacuole, le saccharose est clivé en fructose et en glucose pour créer un gradient de concentration entre la cellule et le phloème permettant d'augmenter « la force » du puits et par conséquent le flux du transport du saccharose. Ainsi « la force » du puits de chaque cellule est tributaire de sa capacité à métaboliser le saccharose. L'hydrolyse du saccharose pourrait être favorisée par les pH faibles. Dans ce cas, le saccharose subit une hydrolyse acide sans l'intervention des enzymes du métabolisme du sucre. Dans le cas contraire, le clivage du saccharose est catalysé par la saccharose invertase et la saccharose synthase (Echeverria et Burns, 1989). La première enzyme a une action unidirectionnelle qui contribue à la formation du glucose et du fructose, alors que la saccharose synthase permet de produire l'UDP-glucose et le fructose à partir du saccharose et

d'UDP (Figure 8). Contrairement à la première, cette réaction est réversible (Hockema et Echeverria, 2000).

Ces deux enzymes du métabolisme des sucres sont très actives durant le stade de division cellulaire (Salisbury et Ross, 1992). Selon Lowell *et al.* (1989), l'activité enzymatique de l'invertase acide est la plus intense au cours de la première phase de croissance dans tous les tissus de transport et de stockage. Cependant il est à noter qu'au cours de la maturation, l'activité de cette enzyme diminue fortement (Holland *et al.*, 1999). Durant les phases I et II, l'activité de la saccharose synthase des tissus transporteurs est plus importante que celle des organes puits. Au cours de la phase II, cette enzyme est la plus active des tissus transporteurs. En revanche, la saccharose phosphate synthase et l'invertase sont surtout actives dans les vésicules du jus (Lowell *et al.*, 1989). Il a également été démontré que les changements de concentration des sucres réducteurs durant la maturation de la mandarine Fortune sont corrélés avec les changements des activités de la saccharose synthase et des invertases alcaline et acide (Holland *et al.*, 1999).

Il est à signaler que le métabolisme du saccharose est un processus très complexe qui ne produit pas seulement des métabolites primaires mais aussi contrôle et oriente le développement du fruit (Koch, 2004). Généralement, les hexoses favorisent la division et l'expansion cellulaire alors que le saccharose favorise la différenciation et la maturation. C'est pour cela que l'activité d'invertase augmente au cours des premières phases du développement et diminue au cours de la phase de maturation en laissant la place à l'activité des saccharose synthases (Borisjuk *et al.*, 2002; Weschke *et al.*, 2003).

### **2.3.3. Les acides chez les fruits des agrumes**

#### **2.3.3.1. Composition du fruit en acides organiques**

L'acidité est l'une des caractéristiques majeures des agrumes. Elle est due à la présence de plusieurs acides organiques tels que les acides citrique, malique, quinique, tartrique et malonique... (Ladanyia, 2008). Les proportions de ces acides varient selon les stades de développement du fruit et les espèces. Au début de la phase de division cellulaire, l'acide quinique présente les concentrations les plus élevées par rapport aux autres acides. Au cours de la maturation, l'ordre change et l'acide citrique devient de loin l'acide majoritaire chez les toutes les variétés sauf pour celles produisant des fruits très faiblement acides et chez qui l'acide malique est majoritaire (Ting et Vines, 1966 ; Albertini *et al.*, 2006). Les acides organiques sont également présents dans la peau, mais leurs concentrations est faible comparativement à celles de la pulpe (Clements, 1964; Ladanyia, 2008).

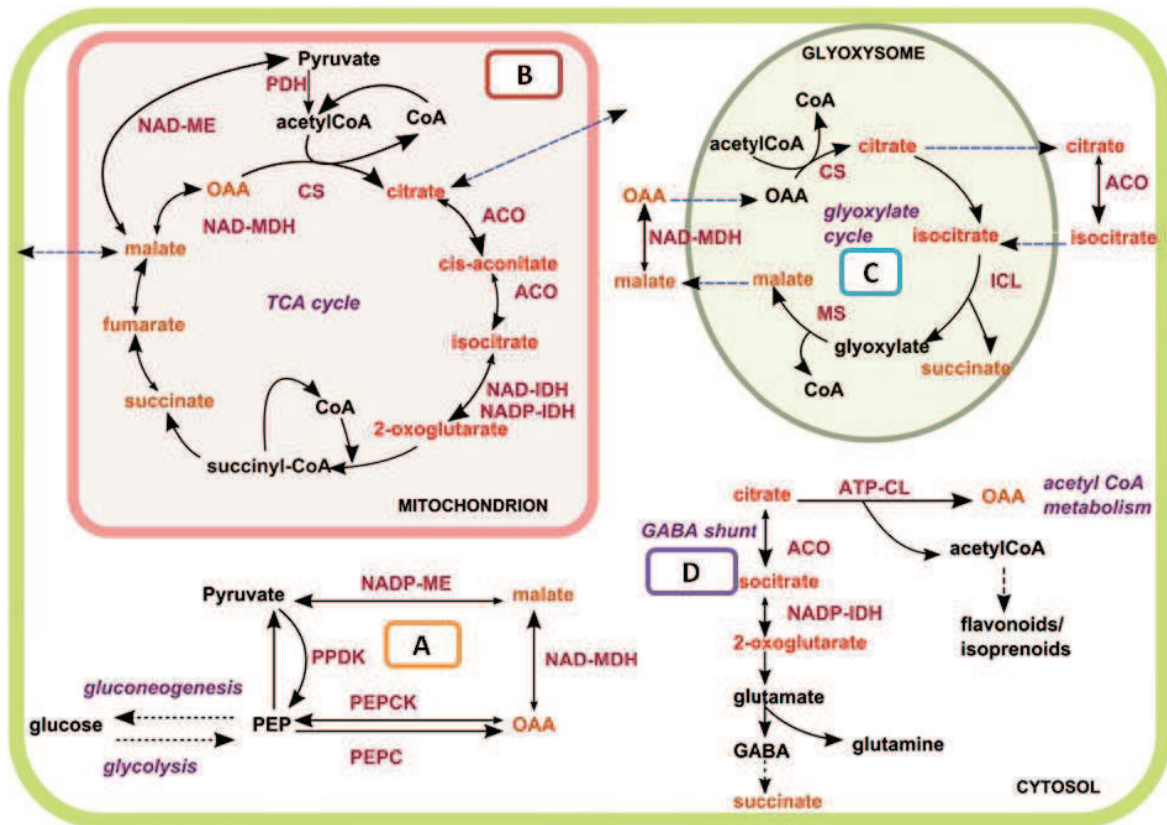
Il a été démontré que les quantités d'acides organiques augmentent considérablement au début du développement du fruit puis diminuent à partir de la deuxième moitié de la phase de différenciation cellulaire et finalement se stabilisent vers des valeurs basses en fin de maturité physiologique (Figure 5). En général, la diminution de l'acidité est due essentiellement à la diminution de la concentration d'acide citrique. Selon les espèces, l'évolution des autres acides organiques diffère au cours de la maturation. Daito et Sato (1985) et Ladanyia (2008) ont montré que chez les variétés de mandarines Satsuma « Okitsu wase » et « Silverhill », l'acide citrique diminue respectivement de 2022 à 802 mg/100 ml de jus et de 2148 à 896 mg/100 ml de jus. Cette diminution de la concentration en acide citrique est accompagnée par celle des acides malique et isocitrique. En revanche, selon Sinha *et al.* (2012), l'acide citrique diminue de 55% au cours de la maturation des mandarines tandis que l'acide malique reste constant.

### **2.3.3.2. Métabolisme des acides**

Plusieurs études ont montré que les acides organiques sont synthétisés au niveau des cellules des vésicules à jus et ne sont pas exportés par les sources (les feuilles matures). La synthèse de ces composés se produit à partir des photo-assimilats principalement via le cycle de Krebs, notamment à partir du saccharose suite à la fixation de CO<sub>2</sub> (Echeverria, 1996; Tadeo *et al.*, 2008).

Le métabolisme des acides organiques fait intervenir trois voies métaboliques principales: une voie de synthèse, une voie de dégradation et une voie qui permet la conversion des acides tri et dicarboxyliques (Etienne *et al.*, 2013).





**Figure 10.** Voies métaboliques des acides citrique et malique.

ACO, aconitase; ATP-CL, ATP-citrate lyase; CS, citrate synthase; ICL, isocitrate lyase; MS, malate synthase; NAD-MDH, NAD-malate déshydrogénase; NAD-ME, NAD-malic enzyme; NAD-IDH, NAD-isocitrate déshydrogénase; NADP-ME, NADP-malic enzyme; NADP-IDH, NADP-isocitrate déshydrogénase; PDH, pyruvate déshydrogénase; PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase; PEPCCK, phosphoénolpyruvate carboxykinase; PPDK, pyruvate orthophosphate dikinase. La direction probable d'une réaction réversible est indiquée par la grosse flèche. Les flèches bleues pointillées indiquent le transport des citrates et des malates. Les acides mentionnés en rouge sont des tricarboxylates et ceux mentionnés en orange sont des dicarboxylates (Etienne *et al.*, 2013).

La première voie métabolique se produit dans le cytosol pendant les premières phases de croissance du fruit qui se traduit par une forte accumulation des acides (Figure 10.A). Le stockage des acides tels que l'acide citrique et l'acide malique se fait dans les vacuoles. La synthèse des acides, commence par la formation du malate et de l'OAA (Oxalo-acétate) suivie par la formation du citrate (Etienne *et al.*, 2013). Ce dernier est synthétisé à partir du PEP (Phosphoénolpyruvate) ; produit du catabolisme des hexoses (Young *et al.*, 1962). Il existe donc un lien direct entre les métabolismes des sucres et des acides au sein du fruit. En effet, l'OAA est obtenu à partir de la carboxylation du PEP catalysé par l'enzyme PEPC

(Phosphoénolpyruvate carboxylase). L'OAA est ensuite réduit en malate sous l'action de NAD-cytMDH (NAD-dependent malate déshydrogénase) (Givan, 1999). Il est à noter que toutes ces réactions sont réversibles. La synthèse du malate et d'OAA est une étape intermédiaire et indispensable pour la synthèse du citrate. Les deux dicarboxylates: le malate et l'OAA sont transformés soit en tricarboxylates, le plus souvent en citrate, soit en dicarboxylate via deux voies métaboliques: le cycle de Krebs (TCA : tricarboxylic acid cycle) et le cycle de glyoxylate (Etienne *et al.*, 2013).

La diminution de l'acidité résulte de la décarboxylation des carboxylates. Il s'agit soit de la conversion des tricarboxylates (citrate) en dicarboxylate (malate, OAA) soit de la décarboxylation des dicarboxylates (Etienne *et al.*, 2013).

La transformation du citrate en dicarboxylates peut se faire à travers plusieurs voies métaboliques tels que : le cycle de krebs (Figure 11B), le cycle de glyoxylate (Figure 10C), la voie de GABA ( $\gamma$ -aminobutyrate) (Figure 10D) et la voie du catabolisme de acétyl-CoA. Toutes ces réactions sont à l'origine des variations d'acidité des fruits mesurée (Etienne *et al.*, 2013).

Ces dicarboxylates produits soit à partir du citrate soit à partir du PEP peuvent subir une décarboxylation d'où la dégradation des acides qui se transforment en d'autres composés chimiques qui seront impliqués dans d'autres voies métaboliques. La décarboxylation des dicarboxylates permet la production du PEP d'où la stimulation de la gluconéogenèse ; voie métabolique de génération du glucose à partir du PEP (Figure 10A) (Sweetman *et al.*, 2009). Le passage de la synthèse des acides organiques à la synthèse des sucres se produit généralement à la fin du développement du fruit (Katz *et al.*, 2011). Le PEP peut provenir également de la conversion du pyruvate catalysé par la PPK (pyruvate orthophosphate dikinase). Quant au pyruvate, il est le produit de la carboxylation du malate par le NAD-cytME (cytosolic NADP-dependant malic enzyme) (Sweetman *et al.*, 2009)

Le cycle de Krebs résulte de l'oxydation du pyruvate et commence par la condensation d'OAA en acetyl-CoA (Figure 10B). Ce cycle est maintenu grâce à des séries de conversions entre les acides organiques y compris le citrate et le malate (Etienne *et al.*, 2013). L'enzyme contrôlant la synthèse du citrate dans la mitochondrie est la citrate synthase mitochondriale (mtCS). Contrairement à la mtCS la mtACO (aconitase mitochondriale) et la NAD-mtIDH (NAD-dependant isocitrate déshydrogénase) catalysent la dégradation du citrate. L'activité de la mtCS est positivement corrélée avec l'accumulation du citrate chez les agrumes (Tao *et al.*,

2001). Il a également été démontré que l'activité de la mtACO et de la NAD-mtIDH diminuent au cours des premiers stades de développement du fruit. Ceci se traduit par une diminution du métabolisme du citrate au niveau de la mitochondrie (Sadka *et al.*, 2000). Le malate peut être oxydé en OAA pour alimenter le cycle de Krebs et par conséquent synthétiser du citrate (Sweetman *et al.*, 2009) ou être transformé en pyruvate d'où la coupure du cycle et la diminution de l'acidité (Macrae et Moorhouse, 1970).

Le citrate synthétisé dans le cycle de Krebs peut être dégradé dans le cytosol via la voie du GABA (Figure 10 D) pour produire le succinate qui peut par la suite être utilisé dans le cycle de Krebs. La dégradation du citrate via la voie de GABA est sous le contrôle des deux enzymes, la cytACO (aconitase cytosolique) et la NADP-cytIDH (NADP-dépendant isocitrate déshydrogénase) (Katz *et al.*, 2011). Une forte accumulation des ARNm des gènes codant pour la cytACO a été observée chez plusieurs génotypes d'agrumes à la même période de diminution d'acidité (Terol *et al.*, 2010).

La dégradation du citrate peut aussi se produire suite au clivage du citrate en OAA et en acétyl-CoA sous l'action d'ATP –citrate lyase (ATP-CL) et conduit à la synthèse des flavonoïdes et des isoprénoïdes (Etienne *et al.*, 2013).

### **2.3.3.3. Transport des acides**

Contrairement aux sucres, les acides organiques synthétisés dans la pulpe ne sont pas exportés dans d'autres organes de l'arbre (Katz *et al.*, 2011). Après leur synthèse ils sont transportés vers les vacuoles où ils sont stockés (Ladanyia, 2008). Le transport des acides du cytosol jusqu'à la vacuole dépend du gradient du potentiel électrochimique à travers la membrane du tonoplaste et de la forme anionique de l'acide qui elle-même dépend du pH du cytosol. Quand le pH est neutre ou légèrement alcalin, le malate et le citrate prennent respectivement une forme dianionique et trianionique. Cependant si le pH est acide, les acides sont protonés ou monoanionés. Etant donné que les transporteurs sont spécifiques aux formes anionées, ce sont seulement le malate dianioné et le citrate trianioné qui passent du cytosol vers la vacuole (Brune *et al.*, 1998).

Le transport du malate chez *Arabidopsis* est facilité par un transporteur spécifique du malate situé au niveau du tonoplaste nommé AttDT (Emmerlich *et al.*, 2003) et deux membres de la famille « aluminium-activated malate transporter » (ALMT) (Kovermann *et al.*, 2007)

Le transport du citrate est beaucoup plus facile et plus rapide que le transport du malate. Il a été mis en évidence que le citrate peut être transporté via AttDT (Martinoia *et al.*, 2007). Cependant, il n'est pas le transporteur principal. Plusieurs travaux suggèrent qu'il existe une pompe du citrate ATP-dépendant (Brune *et al.*, 1998). La diminution de la concentration du citrate durant la maturation montre que le citrate est exporté de la vacuole via le transporteur CsCit1 (Shimada *et al.*, 2006).

#### **2.3.4. Les métabolites secondaires chez les fruits des agrumes**

##### **2.3.4.1. Composition du fruit en métabolites secondaires**

Les agrumes contiennent des nombreux métabolites secondaires. Ils sont très riches en vitamine C, flavonoïdes, caroténoïdes... qui sont bénéfiques pour la santé humaine grâce à leurs propriétés anti-oxydantes (Ladanya, 2008). Les agrumes se caractérisent également par leurs taux élevés en huiles essentielles qui sont composées principalement par des terpénoïdes. Le limonène, un mono terpène, est le composé majeur des huiles essentielles de zestes (Iglesias *et al.*, 2007). Les terpénoïdes volatiles forment la flaveur et les arômes des agrumes. Les principaux flavonoïdes sont les flavanols, les flavanals, les anthocyanes, les flavones et les flavanones. Parmi les flavones on compte les polyméthoxyflavones: la sinensetin, la nobilétine, la tangerétine et la flavone heptamethoxy. Les flavanones sont composées des isonaringines et des hespéridines qui est le flavonoïde prédominant (Del Río *et al.*, 1998).

Parmi les métabolites secondaires, on peut citer des pigments tels que la chlorophylle qui donne la couleur verte, les caroténoïdes qui donnent les couleurs jaune, orange, orange foncée et rouge, les anthocyanes qui donnent la couleur rouge sanguin. Les caroténoïdes sont des tétra-terpénoïdes qui se subdivisent en deux groupes, les carotènes et les xanthophylles (Iglesias *et al.*, 2007). La concentration et la composition des caroténoïdes varient selon les variétés et dépendent des conditions de culture et des facteurs climatiques (Gross, 1987).

##### **2.3.4.2. Evolution des métabolites secondaires au cours de la maturation des fruits**

Au cours de la maturation, la concentration de la chlorophylle diminue tandis que celle de caroténoïdes augmente. Les caroténoïdes sont synthétisés dans la peau et dans la pulpe mais de manière indépendante (Tadeo *et al.*, 2008). Bien que synthétisés plus tôt dans la pulpe au cours du développement du fruit, leur concentration dans les fruits mûrs est beaucoup plus

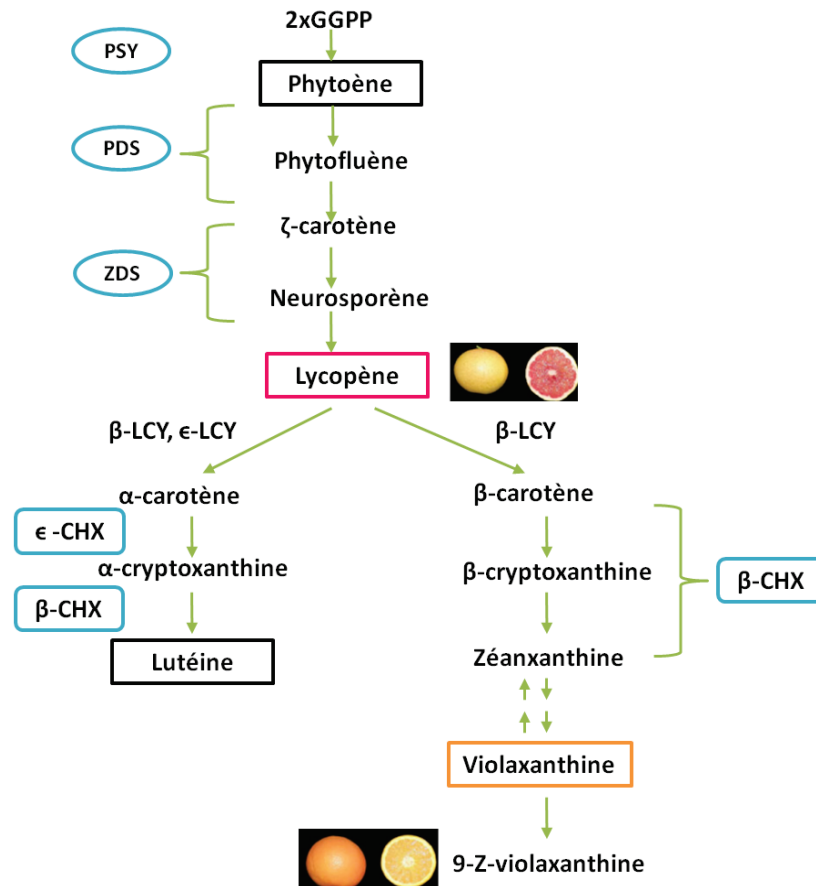
élevée dans la peau qui renferme 70 à 75% de la concentration totale du fruit (Curl et Bailey, 1956).

Parallèlement à l'augmentation de la concentration des caroténoïdes, les teneurs en flavonoïdes diminuent. Leur concentration est négativement corrélée avec le poids du fruit (Hendrickson et Kesterson, 1964).

La maturation est caractérisée aussi par la diminution de la concentration des limonoïdes et des limonines et par l'augmentation de la synthèse des terpenoïdes et par conséquent des huiles essentielles (Ladanyia, 2008).

#### ***2.3.4.3.Métabolisme des caroténoïdes***

La première étape dans la synthèse des caroténoïdes concerne la formation d'une molécule incolore le phytoène (phy;C40) suite à la condensation de deux molécules de geranylgeranyl pyrophosphate. La réaction est catalysée par la phytoène synthase (PSY). Les désaturases PDS (Phytoène désaturase) et ZDS (Zeta-carotène désaturase) ajoutent chacune deux doubles liaisons. Ensuite le PDS produit du  $\zeta$ -carotène. Cette étape est suivie par la synthèse du lycopène (LYC). La molécule de lycopène subit des cyclisations sous l'action de  $\epsilon$ -LCY and  $\beta$ -LCY pour donner les deux molécules  $\alpha$ -carotène et  $\beta$ -carotène. L' $\alpha$ -carotène est ensuite converti en lutéine par des hydroxylations successives catalysées par  $\epsilon$ -carotène hydroxylase ( $\epsilon$ -CHX) et  $\beta$ -carotène hydroxylase ( $\beta$ -CHX). Tandis que le  $\beta$ -carotène est catabolisé en zéaxanthine suite à deux hydroxylations catalysées par  $\beta$ -CHX. Zéaxanthine est ensuite convertie en violaxanthine par le zéa époxidase (ZEP) (Figure 11) (Cunningham Jr et Gantt, 1998; Kato *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2007 ; Fanciullino *et al.*, 2008).



**Figure 11.** Voie de biosynthèse des caroténoïdes. GGPP, géranylgeranyl diphosphate; PSY, phytoène synthase; PDS, phytoène désaturase; ZDS, f-carotène désaturase; PTOX, plastid terminal oxidase; CRTISO, carotène isomérase; e-LCY, lycopène e-cyclase; b-LCY, lycopène b-cyclase; b-CHX, b-carotène hydroxylase; e-CHX, e-carotène hydroxylase; ZEP, zéaxanthine époxidase; VDE, violaxanthine de-époxydase; NSY, néoxanthine synthase (Alquézar *et al.*, 2009).

## 2.4. Contrôle de la maturation des fruits des agrumes

### 2.4.1. Effet environnemental

Comme pour tous les arbres fruitiers, le développement et la maturation des fruits d'agrumes sont fortement influencés par l'environnement qui représente une composante principale de la variation des caractères de production et de la qualité du fruit. L'environnement englobe plusieurs facteurs biotiques et abiotiques qui ont des effets directs et indirects sur l'arbre. Parmi ces facteurs on peut citer: les pratiques culturales, le climat, le sol,... (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996)

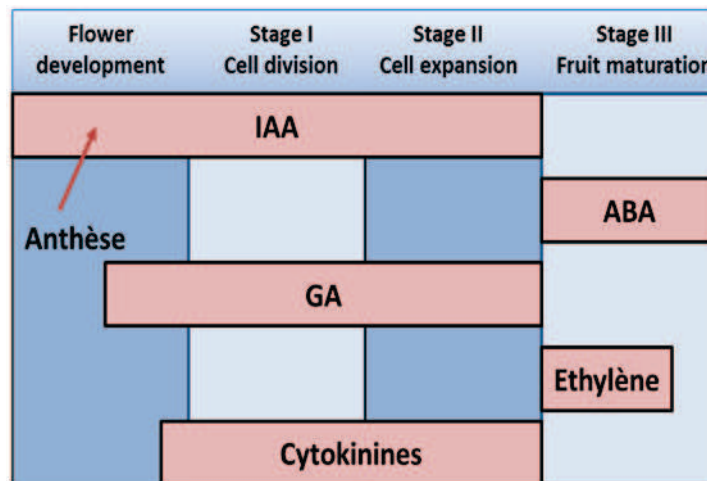
Parmi eux, le climat demeure le facteur qui a le plus d'influence (Ladanyia, 2008). Son impact se décline en fonction de l'intensité et de la variation des paramètres climatiques (température, précipitation, vent, etc.). La température est considérée comme le premier

facteur qui intervient dans la délimitation des zones de production des agrumes dans les deux hémisphères Nord et Sud (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996). Ce facteur climatique agit sur plusieurs processus physiologiques de la croissance des arbres et du développement des fruits. Il agit sur la cinétique d'évolution de la maturation ainsi que sur les teneurs en métabolites primaires et secondaires (Kimball et Box, 1984 ; Barry et van Wyk, 2006; Dhuique-Mayer *et al.*, 2009). Les acides organiques font partie des métabolites primaires dont la concentration change en fonction de la température. En effet des températures élevées entraînent une diminution de la concentration des acides organiques notamment de l'acide citrique et de l'acide malique et par conséquent une baisse d'acidité du fruit (Lobit *et al.*, 2006). Des températures élevées stimulent également la respiration qui est un processus très consommateur d'énergie. En effet, au cours de la respiration les acides sont utilisés comme substrats pour libérer de l'énergie et entraîne donc une diminution de l'acidité (Ladanyia, 2008). La température ne module pas seulement les teneurs en acides mais également les teneurs en sucres. En fait, l'accumulation des sucres dépend principalement de la température ainsi que de l'intensité lumineuse perçue par les arbres (Kimball et Box, 1984). En effet, des températures élevées favorisent l'obtention de fruits plus sucrés (Kimball et Box, 1984; Richardson *et al.*, 2000). Il est à signaler aussi que la température régit la vitesse du processus de maturation. La période de maturation devient ainsi plus courte (Bain, 1949; Kimball et Box, 1984). Cette relation étroite entre la maturation et la température a été étudiée dans plusieurs travaux pour estimer la période de maturité du fruit via le calcul des degrés jours, somme de températures comprise entre 13°C et 36°C (favorables à la croissance végétative et à l'activité métabolique) durant la croissance du fruit (Stenzel *et al.*, 2006 ; Chelong et Sdoodee, 2013). La coloration est un autre processus dont le déroulement est sous l'induction de la température. Les processus de dégradation de la chlorophylle et de synthèse des caroténoïdes se déclenchent seulement s'il y a assez d'amplitude thermique entre le jour et la nuit (Mesejo *et al.*, 2012). C'est la raison pour laquelle les fruits des zones tropicales sont beaucoup moins colorés que les fruits du bassin méditerranéen (Ladanyia, 2008). La température agit même sur la forme du fruit. Des pomelos cultivés sous des températures élevées donnent des fruits plus gros avec une peau plus épaisse (Susanto et Nakajima, 1990). En plus de la température et de la radiation solaire qui stimulent la production des sucres, la maturation est influencée également par l'hygrométrie. Une hygrométrie supérieure à 80% est considérée comme propice pour obtenir des fruits plus juteux, de forme plus régulière et à peau plus fine (Jacquemond *et al.*, 2013). Les agrumes sont de grands consommateurs d'eau et sont très sensibles à la sécheresse (Praloran, 1971). Le déficit hydrique fait augmenter l'acidité ainsi que la sucrosité du fruit au cours de la maturation (Pérez-Pérez *et al.*, 2008 ; Navarro *et al.*, 2010). En effet,

il conduit à une augmentation immédiate de l'activité saccharose synthase, un des déterminants de la « force du puits ». L'augmentation de l'activité de cette enzyme permet le maintien d'un gradient entre le phloème et les cellules du stockage par clivage du saccharose. Les cellules continuent donc à importer du saccharose au cours de la maturation ce qui contribue à l'augmentation de la teneur en sucres (Hockema et Echeverria, 2000). Le déficit hydrique, la salinité, l'alcalinité du sol sont des contraintes pédologiques qui ont un effet sur le processus de croissance et de maturation du fruit. Par exemple, la chlorose ferrique souvent rencontrée dans le bassin méditerranéen à cause de l'alcalinité des sols, entraîne souvent un retard de maturation (Iglesias *et al.*, 2007). Pour faire face à ces contraintes liées au sol, l'utilisation d'un porte-greffe tolérant est indispensable. En fonction du type de porte-greffe utilisé, une meilleure adaptation aux conditions pédo-climatiques peut être obtenue. Le porte-greffe peut aussi influencer la croissance et la maturation du fruit (Godfrey-Sam-Aggrey, 1973; Pérez-Pérez *et al.*, 2008).

#### 2.4.2. Contrôle hormonal

Durant la maturation, les concentrations des gibbérellines, des auxines et des cytokinines diminuent considérablement au dépend de l'éthylène et de l'acide abscissique dont leurs concentrations augmentent (Figure 12) (Bouzayen, 2002; Sinha *et al.*, 2012 ; Ferguson *et al.*, 2014).



**Figure 12.** Hormones contrôlant la croissance et la maturation des fruits des agrumes (Ferguson *et al.*, 2014)

Chez les agrumes en cours de maturation, l'acide abscissique existe sous deux formes, une forme libre et une forme conjuguée. Au début de la croissance du fruit, le taux d'ABA conjugué est quatre fois plus élevé que le taux d'ABA libre. En effet, la concentration de sa



forme libre et de sa forme conjuguée varie respectivement de 3 à 8 µg/g et de 10 à 39 µg de matière sèche chez différentes espèces d'agrumes. Tandis que l'ABA libre augmente progressivement au cours de la croissance du fruit pour atteindre une valeur maximale à la fin de la maturation, l'ABA conjugué diminue (Ladanyia, 2008).

Les agrumes sont ainsi des fruits non climactériques dont la synthèse d'éthylène n'est pas accompagnée par une crise climactérique (Sinha *et al.*, 2012). Chez la mandarine Satsuma, la concentration d'éthylène au cours de la maturation est de l'ordre de 0.16 µl/kg/h (Hyodo et Nishino, 1981). Cette concentration est faible comparativement aux fruits climactériques tel que la poire dont la concentration de l'éthylène varie de 0.5 à 10 µl/kg/h au cours de la maturation. Chez les agrumes, l'éthylène est synthétisé en faibles quantités qui sont toutefois suffisantes pour déclencher le processus de maturation (Sinha *et al.*, 2012). Cette hormone stimule la synthèse des sucres au détriment des acides, la dégradation de la chlorophylle et la synthèse des caroténoïdes (Iglesias *et al.*, 2007 ; Ferguson *et al.*, 2014).

Au cours de la maturation, les mécanismes de coloration du flavédo du fruit sont régis à la fois par l'éthylène et l'ABA qui interagissent tout au long de ce processus. En effet, l'éthylène initie la coloration par le déclenchement de la dégradation de la chlorophylle et la synthèse des caroténoïdes mais aussi par la stimulation de la synthèse d'ABA. Ce dernier contrôle la vitesse de coloration. Plus la concentration d'ABA est élevée plus le fruit atteint sa coloration rapidement (Kanellis, 1999).

### **2.4.3. Contrôle génétique**

La maturation est une phase de développement génétiquement programmée qui met en œuvre l'expression des gènes spécifiques avec ou sans modulation des facteurs environnementaux.

#### **2.4.3.1. Contrôle génétique de la synthèse des sucres**

Le métabolisme des sucres est sous le contrôle complexe de plusieurs groupes de gènes : l'expression de certains gènes favorise la synthèse des sucres, d'autres gènes favorisent leur dégradation (Cercós *et al.*, 2006; Katz *et al.*, 2011).

La synthèse du saccharose peut se faire via plusieurs voies métaboliques selon les phases de croissance du fruit. La saccharose phosphate synthase est une enzyme impliquée dans l'une des voies majeures de la synthèse du saccharose. Le gène codant pour cette enzyme est surexprimé pendant les deux phases II et III. Cependant, l'expression du gène codant pour la saccharose-6-phosphate phosphatase ; enzyme catalysant la synthèse du

saccharose à partir du sucrose-6-P ; diminue pendant la phase II et augmente pendant la phase III (Katz *et al.*, 2011).

Le saccharose peut être transporté par des transporteurs spécifiques et dégradé par l'invertase en fructose et en glucose. Ces derniers sont transportés par les transporteurs des hexoses. Très peu de gènes codants pour les transporteurs des sucres ont été identifiés. Parmi ces gènes on peut citer le *CTG1108654* ; transporteur d'hexose, le *CTG1105250* et le *CTG1106455*; transporteurs du glucose et le *CTG1107685* ; transporteur du saccharose. Le saccharose transporté dans les vésicules à jus peut être métabolisé de trois façons ; dégradé par la saccharose synthase, dégradé par l'invertase cytosolique dans le cytosol ou stocké dans la vacuole (Katz *et al.*, 2007).

Le passage de la phase d'élargissement cellulaire à la phase de maturation se caractérise par la surexpression de la plupart des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la dégradation des sucres tels que l'hexokinase, la fructokinase, la glucose-6-phosphate isomérase, la fructose biphosphate aldolase, l'ATP-dépendant 6-phosphofructose-1-kinase, la triose-phosphate isomérase et l'énolase protéin. Les deux gènes codant pour le pyruvate ; *iCitrus ID 52671* et *iCitrus ID 28935* sont également surexprimés au cours de cette phase de transition (Katz *et al.*, 2011).

Très peu de gènes codants pour la saccharose synthase ont été identifiés. Il s'agit du *CTG1104251*, du *CTG1098335*, du *CTG1097731* (homologues à *AtSUS1* d'*Arabidopsis thaliana*) et d'un autre gène homologue à *AtSUS2*. Selon Komatsu *et al.* (2002), parmi ces trois gènes, il n'y a qu'un seul gène *CTG1104251* (nommé aussi *CitSUSA*) qui est exprimé au cours de la maturation. En revanche, l'étude de Katz *et al.* (2007) montre qu'il y a au moins deux autres gènes qui sont exprimés dans les fruits matures *SUS1* and *SUS2*. Tandis que l'expression de *CitSUS1* diminue au cours de la maturation, l'expression de *CitSUSA* augmente. Ce dernier joue un rôle de « force du puits » (Katz *et al.*, 2011).

L'invertase ayant un rôle clé dans la dégradation des sucres, elle est inactive au cours de la maturation (Holland *et al.*, 1999 ; Cercós *et al.*, 2006). En effet, les gènes codant pour l'invertase acide ; *bFruct1* et *bFruct2* et pour l'invertase alcaline *CitCINVI* ne sont pas exprimés pendant la maturation. Ceci est probablement dû à l'invertase inhibitrice dont l'action inhibe les invertases acides et alcalines. Les gènes codant pour l'invertase inhibitrice s'expriment au cours de la maturation. Ces faits soulignent l'importance de la saccharose synthase dans la dégradation des sucres au cours de la phase finale de la croissance du fruit

(Katz *et al.*, 2011). Ainsi, tandis que l'invertase facilite l'expansion des cellules « puits » et le stockage des sucres pendant les premières phases de croissance du fruit, la saccharose synthase prends le relais pendant la maturation en favorisant les voies de clivage du saccharose (Katz *et al.*, 2007; Koch, 2004).

#### **2.4.3.2. Contrôle génétique du métabolisme d'acide citrique**

La synthèse du citrate se fait par deux réactions chimiques dont l'une est catalysée par l'ATP citrate lyase et la deuxième est catalysée par la citrate synthase. Trois gènes codant pour la citrate synthase ont été identifiés dans les cellules des vésicules à jus chez les agrumes: le *CTG1107592*, le *CTG11111984* et le *CTG1105142* (Katz *et al.*, 2007). Les deux premiers sont homologues à *At3g58750 (CSY2)* et à *At2g42790 (CSY3)*. Les protéines codées par ces gènes sont localisées dans le peroxyosome d'*Arabidopsis thaliana*. En revanche, *CTG1105142* est homologue à l'*At2g44350 (CYS4)* qui est un gène mitochondrial chez *Arabidopsis thaliana* (Pracharoenwattana *et al.*, 2007). Un gène codant pour l'ACL, homologue du gène *At3g06650* d'*Arabidopsis thaliana* a également été mis en évidence (Katz *et al.*, 2007).

L'acide citrique accumulé au niveau de la vacuole est ensuite transloqué vers le cytosol pour être métabolisé en acide isocitrique puis en 2-oxoglutarate sous l'action successive d'aconitase cytosolique et d'isocitrate NADP. Il a été remarqué que l'expression des gènes codant pour l'aconitase cytosolique et l'isocitrate NADP augmente pendant la maturation des fruits ce qui suggère leur implication dans le catabolisme de l'acide citrique (Cercós *et al.*, 2006). La surexpression de ces gènes caractérise selon Katz *et al.* (2011) la transition de la phase II à la phase III.

L'aconitase est codée par trois gènes ; *CcAco1*, *CcAco2* and *CcAco3*. Selon Terol *et al.* (2010), les deux gènes *CcAco1*, *CcAco2* sont associés à la détermination de la période de diminution d'acidité. De façon similaire, la décarboxylation de l'isocitrate en 2-oxoglutarate est régulée par trois gènes d'IDH (isocitrate NADP). Il s'agit du *CTG1093369* et du *CTG1107030*, deux gènes mitochondriaux codant pour le NAD<sup>+</sup>-dépendent et du *CTG1102843* codant pour le NADP<sup>+</sup>-dépendent. Trois autres isoformes dont deux localisées dans la mitochondrie et une autre localisée dans le cytosol ont également été mises en évidence. Ceci semble donc confirmer que le citrate est transporté de la mitochondrie pour être catabolisé dans le cytosol en isocitrate et en 2-oxoglutarate (Katz *et al.*, 2007).

Plusieurs autres réactions enzymatiques se suivent suite à la synthèse de 2-oxoglutarate. Une cascade de réactions est déclenchée suite à la production de ce substrat qui finit par la synthèse du succinate. Plusieurs gènes codant pour des enzymes catalyseurs de ces

réactions ont été identifiés. Chaque gène est présent sous différentes formes telles que le gène codant pour le 2-oxoglutarate dehydrogenase qui est présent sous deux formes ; le *CTG1106938*, homologue de l'*At3g55410* et un isoforme homologue à l'*At5g65750*. L'expression de ces gènes augmente au cours de la maturation (Katz *et al.*, 2007)

Des études d'expression par puce à ADN et par PCR en temps réel indiquent qu'une augmentation continue de l'expression des gènes codant pour l'aspartate aminotransférase et l'alanine aminotransférase contribuent à la synthèse de glutamate (Katz *et al.*, 2011). L'augmentation de l'expression des gènes codant pour le glutamate au cours de la maturation des fruits ne se traduit pas par une augmentation de concentration. En effet la teneur en glutamate reste constante tout au long de ce processus ce qui suggère que le glutamate est utilisé dans d'autres voies de synthèse. Les études d'expression qui s'intéressent au métabolisme des acides ont mis en évidence l'existence de deux voies d'utilisation du glutamate: la conversion en glutamine ou en GABA (acide gamma-aminobutyrate aminotransférase). L'augmentation de l'expression de *c-thi1*, gène codant pour l'enzyme de synthèse de thiasole, montre que la glutamine est utilisée pour la production de la thiamine suite à l'action combinée de thiasole et d'aminométhylpyrimidine. En ce qui concerne la voie de synthèse de GABA, les études d'expression par puce à ADN et par PCR en temps réel montrent que les plus hauts niveaux d'expression des gènes codants pour le glutamate décarboxylase et le GABA aminotransférase (enzymes catalysant la synthèse d'acide succinique) sont induits au cours de la période caractérisée par la perte d'acidité (Cercós *et al.*, 2006; Katz *et al.*, 2011).

#### **2.4.3.3. Contrôle génétique du métabolisme des caroténoïdes**

Plusieurs changements dans les voies du métabolisme secondaire ont lieu durant le développement de la pulpe. Parmi ces changements on peut citer:

- une diminution du nombre de récepteurs de la réductase protochlorophyllide d'où la diminution de la biosynthèse de chlorophylle au bénéfice de l'accumulation des caroténoïdes ce qui permet le virement de la couleur du jus vers sa couleur typique selon les variétés ;
- une répression de la chalcone synthase, de la chalcone isomérase et de la flavonoïdes-3-monooxygénase indiquant une diminution de la synthèse des anthocyanes et des flavonoïdes au niveau des fruits matures (Cercós *et al.*, 2006).

En ce qui concerne la synthèse des caroténoïdes, la maturation est marquée aussi par un changement des voies métaboliques dans le flavédo qui bascule de la synthèse des  $\beta,\epsilon$  - caroténoïdes vers celle des  $\beta,\beta$ -caroténoïdes. Ce changement se traduit par une augmentation de l'expression du gène *CitLCYb* contre une diminution de celle du *CitLCYe*. Cette phase se

caractérise également par une augmentation simultanée de l'expression des gènes codant pour la synthèse des xanthophylles (*CitPSY*, *CitPDS*, *CitZDS*, *CitLCYb*, *CitHYb*, and *CitZEP*) dans le flavédo et les sacs à jus de la mandarine Satsuma et de l'orange Valencia (Kato *et al.*, 2004).

### **3. L'abscission des fruits au cours de la maturation des agrumes**

#### **3.1. Qu'est-ce que l'abscission ?**

L'abscission est un processus de disjonction cellulaire qui résulte de la décomposition de la lamelle moyenne riche en composés pectiques. Ces derniers assurent dans le cas normal l'adhésion des cellules et par conséquent la tenue des tissus végétaux. Leur dégradation conduit donc à une séparation cellulaire. Dans le cas d'abscission, la dissociation cellulaire est suivie par un détachement de l'organe concerné de la plante mère (Lewis *et al.*, 2006; Morre, 1968). L'abscission peut se produire au niveau des structures végétatives (les feuilles) mais aussi au niveau des structures reproductives tels que les fleurs, les bourgeons floraux, les petits fruits et les fruits matures (Brown, 1997).

#### **3.2. Vagues d'abscission**

Chez les agrumes, l'abscission des structures reproductives commence depuis la floraison et parfois même un peu avant. En effet, le développement du fruit est souvent accompagné par une chute modérée des structures reproductives mais dans certain cas, la chute peut-être considérable. Le taux et la sévérité de ce phénomène varie en fonction des stades de croissance. Quand la chute devient excessive on parle de vague d'abscission (Iglesias *et al.*, 2007).

Plusieurs vagues d'abscission caractérisent le développement et la croissance des fruits chez les agrumes (Iglesias *et al.*, 2007). La première vague survient au début de la phase I du développement du fruit: phase de division cellulaire. Au cours de cette vague, on assiste à une chute importante des bourgeons, des fleurs et des ovaires. Moins de 1% des fleurs donne naissance à un fruit qui atteint la maturité (Jacquemond *et al.*, 2013). Cette vague est suivie d'une deuxième qui se produit ultérieurement pendant le développement des fruits lors du passage de la phase I à la phase II. Au cours de cette transition, l'arbre perd beaucoup de petits fruits. Cette vague d'abscission est connue sous le nom de « chute de juin » (Iglesias *et al.*, 2007). Ces deux premières vagues peuvent être considérées comme une autorégulation de la charge de l'arbre (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996). L'abscission ne concerne pas seulement les fleurs et les petits fruits mais elle concerne aussi les fruits matures. A la fin de la phase de maturation, cette chute de fruit peut soit s'étaler dans le temps ou soit être subite et massive. Dans

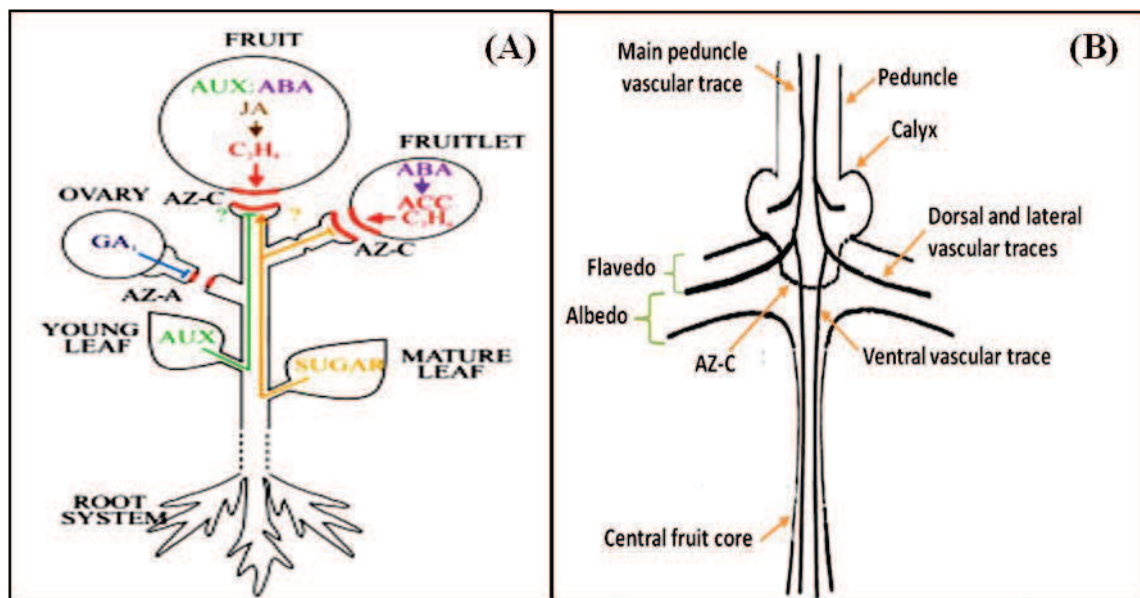
certaines conditions et pour certaines variétés cette chute massive des fruits survient avant la récolte (Raesko *et al.*, 2006).

### 3.3. Zones d'abscission

L'abscission se produit au niveau des sites prédéterminés nommées zones d'abscission (AZs) constituées des cellules spécialisées (Sexton et Roberts, 1982 ; Estornell *et al.*, 2013).

#### 3.3.1. Localisation des zones d'abscission

Les fruits des agrumes ont généralement deux zones d'abscission : AZ-A située entre la brindille et le pédoncule et AZ-C située au niveau du calice (Figure 13A). Les zones d'abscission ne sont pas actives tout au long de la vie de l'organe reproductif (Estornell *et al.*, 2013). Au cours des premières semaines du développement du fruit, l'abscission des bourgeons floraux et des fleurs se produit au niveau de la zone AZ-A. Au bout de 8 semaines, la zone AZ-A devient progressivement inactive. La désactivation de la zone AZ-A se produit parallèlement à l'activation de la zone AZ-C. Ainsi, la chute des petits fruits et des fruits matures a lieu au niveau de la zone AZ-C. Il est à noter que la chute des fleurs et des fruits qui ont moins de 8 semaines peut avoir lieu parfois au niveau de la zone AZ-C. Cependant l'abscission des fruits au cours de la maturation ne peut se produire qu'au niveau de la zone AZ-C à cause de la forte lignification de la zone AZ-A (Goren et Huberman, 1976).



**Figure 13.** (A) Zones d'abscission chez les agrumes (Iglesias *et al.*, 2007) (B) Coupe longitudinale de la tige au niveau de la zone AZ-C (Burns, 1998).

La zone AZ-C est localisée au niveau de l'intersection entre les tissus du calice, du flavédo et d'albédo (Figure 13 B). La totalité des tissus vasculaires transportant l'eau et les

carbohydrates passent par la zone AZ-C dont la rigidité est liée essentiellement à la présence de ces tissus vasculaires. Par conséquent, et suite à l'abscission tous les tissus vasculaires ventraux de la columelle centrale et les tissus vasculaires dorsaux et latéraux qui encerclent le fruit sont rompus au cours de l'abscission (Cooper et Henry, 1968).

### **3.3.2. Morphologie, Anatomie et métabolisme des zones d'abscission**

Au cours de l'abscission, les zones d'abscission reçoivent des signaux inter et intracellulaires spécifiques. Plusieurs preuves morphologiques et biochimiques montrent que les cellules constituant les zones AZs réagissent d'une façon différente par rapport à leurs voisines qui reçoivent les mêmes signaux hormonaux (Brown, 1997).

Il est à signaler que l'abscission ne concerne pas toute la zone AZ. La séparation ne se produit qu'au niveau d'une couche cellulaire située au niveau de l'extrémité distale constituée d'une à cinq cellules. Cette couche est nommée la couche de séparation (Racsó *et al.*, 2006). Les cellules constituant les AZ sont morphologiquement et anatomiquement différentes du reste des cellules. Elles sont plus petites, isodiamétriques, leur cytoplasme est dense, leur espace intercellulaire est étroit, elles contiennent beaucoup d'amidon et elles sont interconnectées avec plusieurs plasmodesmes (Sexton et Roberts, 1982 ; Estornell *et al.*, 2013).

La AZ ne se distingue pas uniquement par sa morphologie et son anatomie mais aussi par son métabolisme. Cette zone se caractérise par une division cellulaire intense, une synthèse importante des protéines et des ARN, une consommation d'O<sub>2</sub> très élevée et une activité intense de peroxydase (Racsó *et al.*, 2006). Le cytoplasme devient plus dense et il contient beaucoup plus d'organites cellulaires. L'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique sont très visibles (Sexton et Redshaw, 1981). La lamelle moyenne qui permet aux cellules de s'associer l'une à l'autre en tissus grâce à sa composition en pectines joue un rôle primordial au cours de l'abscission. En effet, suite à l'activation du processus d'abscission les enzymes telles que la cellulase, la pectine-estérase et la galacturonase dégradent les composés pectiques de cette zone. Les cellules deviennent ainsi facilement séparables (Roberts *et al.*, 2002). A ce stade, un stress mécanique tel que le vent peut conduire à la chute du fruit (Racsó *et al.*, 2006).

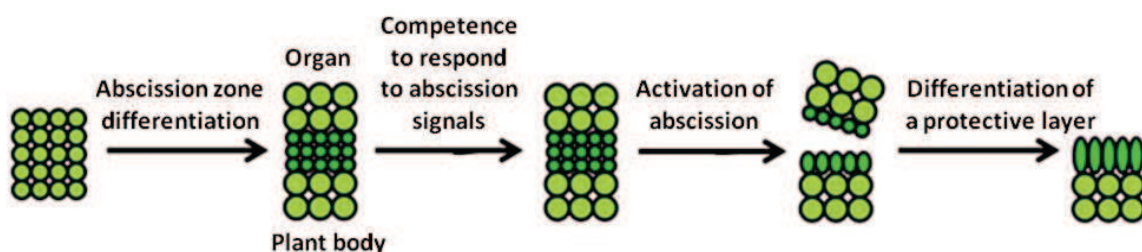
Au cours de l'abscission, les tissus conducteurs ; le phloème et le xylème situés dans la zone d'abscission se bouchent. Ainsi, les métabolites ne peuvent plus circuler. En effet, une boursouffure interne appelée thyllose se forme suite à l'hypertrophie des cellules parenchymateuses dans l'xylème. La thyllose entraîne l'éclatement des cellules transporteuses des métabolites. Le xylème localisé au niveau de la lamelle moyenne se fragmente mais les

cellules constituant la lamelle restent intactes. Quant au phloème, il est obstrué par de la callose qui est un polysaccharide. Ces modifications restent localisées au niveau de la zone d'abscission qui construit « une digue » empêchant la propagation de ces processus dans les zones voisines (Racskó *et al.*, 2006).

Parfois le détachement du fruit mature au cours de la récolte ne se produit pas au niveau de la zone AZ-C. Ceci n'arrive que si le fruit n'a pas achevé sa maturation. Souvent, la récolte mécanique des fruits qui n'ont pas encore atteint leur maturité optimale engendre des blessures au niveau des fruits. En effet, avant maturation, la zone AZ-C n'est pas encore bien formée. Dans ce cas, la pression mécanique exercée au cours de la récolte conduit au détachement du fruit au niveau de la structure la plus fragile. Dans certains cas, quand il s'agit d'une variété qui se pèle facilement, la peau représente le point de détachement le plus fréquent d'où l'obtention d'un fruit non commercialisable (Burns, 1998).

### 3.4. Etapes de l'abscission

Le phénomène d'abscission se déroule en plusieurs étapes. Selon Bonghi *et al.* (2000), il y a trois étapes majeures: (A) la détermination génétique de la compétence cellulaire pour la réponse à l'abscission, (B) la différenciation de la zone d'abscission et (C) l'activation des processus de séparation cellulaire. Cependant, (Estornell *et al.*, 2013; Niederhuth *et al.*, 2013) ont défini quatre principales étapes dont l'ordre change un peu par rapport à ce qui été publié par (Bonghi *et al.*, 2000). La première étape consiste à la différenciation de la zone AZ au niveau du futur site de détachement. La deuxième étape consiste à l'acquisition de la zone AZ à une compétence lui permettant de réagir aux signaux d'abscission. Pendant la troisième étape on note une activation du processus d'abscission. Cette étape est suivie par l'étape de la différenciation d'une couche protectrice au niveau de la surface de la couche de séparation du côté de la plante mère (Figure 14) (Estornell *et al.*, 2013; Niederhuth *et al.*, 2013).



**Figure 14.** Etapes d'abscission (Estornell *et al.*, 2013)

Il est à noter que la plupart des informations moléculaires et biochimiques disponibles jusqu'à maintenant sont reliées à l'étape de l'activation du processus d'abscission alors que le



reste des aspects demeurent très peu connus. Les études sur l'activation des zones d'abscission ont impliqué notamment des caractérisations anatomiques et structurales, l'identification d'enzymes hydrolytiques responsables de la séparation des cellules, l'identification de gènes responsables de l'abscission et la détermination de l'implication d'hormones, notamment les auxines et l'éthylène, dans ce processus (Bonghi *et al.*, 2000).

### **3.5. Contrôle de l'abscission des fruits**

Le contrôle de l'abscission des fruits chez les agrumes est un phénomène complexe régulé à trois niveaux: environnemental, moléculaire et métabolique. Ces trois facteurs agissent simultanément ou l'un stimule l'activation de l'autre, le tout fonctionnant *via* des signaux hormonaux (Iglesias *et al.*, 2007).

#### **3.5.1. Effet environnemental**

L'abscission est un processus souvent influencé par l'environnement. La température, le vent, la radiation solaire, les facteurs biotiques, la nutrition et le stress sont des facteurs qui ont un effet direct ou indirect sur la chute des fruits (Addicott, 1982).

La réponse de la plante au stress se fait via la synthèse des hormones et de leurs précurseurs. Ces signaux hormonaux vont induire le déclenchement de l'abscission au niveau de la AZ (Estornell *et al.*, 2013).

Le stress hydrique est l'un des facteurs environnementaux les plus importants qui provoquent la chute des fruits (Racsó *et al.*, 2007). Une corrélation positive existe entre la sévérité de la sécheresse et le pourcentage d'abscission (Blanke et Bower, 1991) Les agrumes possèdent un comportement particulier vis-à-vis du déficit hydrique. En effet, les feuilles et les fruits ne chutent pas pendant la période du stress mais après la réhydratation (Addicott, 1982). En réponse au déficit hydrique, la concentration d'ABA, hormone souvent associée à l'activation de l'abscission, augmente. Ensuite l'ABA accumulé au niveau des racines stimule la synthèse d'ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) qui est un précurseur de l'éthylène (Tadeo *et al.*, 2008). L'ABA entraîne aussi un blocage des flux dans le xylème. Après la réhydratation, le transport des métabolites et des photo-assimilats est restauré. L'ACC est ainsi transporté des racines vers les feuilles et les fruits où il sera oxydé pour synthétiser de l'éthylène. L'éthylène déclenche par la suite l'abscission (Iglesias *et al.*, 2007). Le déficit hydrique étant souvent accompagné par des températures élevées, il conduit aussi à l'arrêt de la croissance et la stimulation de l'abscission (Tudela et Primo-Millo, 1992). La combinaison du

vent sec et des températures élevées produit le même effet qu'un déficit hydrique même quand il s'agit d'un sol humide. Ces conditions suffisent à déclencher la chute (Yakushiji *et al.*, 1998).

Le déclenchement de la production d'éthylène qui est généralement suivie par l'activation de l'abscission n'est pas causé uniquement par la sécheresse et par les températures élevées mais il l'est aussi par l'asphyxie racinaire due aux excès d'eau (Vu et Yelenosky, 1991).

L'abscission peut également être déclenchée suite à une forte compétition carbonée entre les différents organes de l'arbre. Une telle compétition entraîne un stress nutritionnel dû au manque de photo-assimilats. Ce type de stress enclenche l'envoi de signaux hormonaux vers les zones d'abscission AZs entraînant leur activation (Estornell *et al.*, 2013).

A ces facteurs abiotiques se rajoutent les facteurs biotiques qui influencent l'abscission. En effet, la chute des fruits est parfois causée par des maladies et des insectes. Par exemple, les fruits piqués par la mouche méditerranéenne chutent très rapidement (Racsó *et al.*, 2007).

### **3.5.2. Contrôle hormonal**

Des changements hormonaux se produisent avant et tout au long du processus d'abscission indiquant l'implication de plusieurs hormones dans la régulation de ce processus. Cette régulation ne se fait pas uniquement via les hormones stimulatrices d'abscission telles que l'éthylène et l'acide abscissique mais aussi via les hormones inhibitrices telles que les auxines, les cytokinines et les gibbérellines. Le degré d'implication de chaque hormone ainsi que son action varie selon sa concentration, son interaction avec les autres hormones et le stade de développement du fruit. La balance hormonale est ainsi un facteur clé dans le contrôle de l'abscission (Ladanyia, 2008 ; Addicott, 1982; Estornell *et al.*, 2013).

Chez les agrumes, bien que l'éthylène ne soit pas synthétisé en grandes quantités comparativement aux fruits climactériques, cette hormone est néanmoins considérée comme l'hormone clé pour le déclenchement de l'abscission (Burns, 1998). Généralement, le niveau d'éthylène augmente au cours de la maturation (Ladanyia, 2008) et active la synthèse des enzymes responsables de la dégradation des zones d'abscission (Addicott, 1982; Gómez-Cadenas *et al.*, 2000). A l'inverse des autres hormones telles que les auxines, l'ABA, les gibbérellines qui sont des hormones intermédiaires, l'éthylène est considéré comme étant l'hormone activatrice finale de l'abscission (Tudela et Primo-Millo, 1992).

Les auxines sont présentes dans la zone AZ-C (Goren et Goldschmidt, 1970). Avant l'induction de l'abscission, une concentration élevée en auxines inhibe la sensibilité des cellules de la zone AZ-C vis-à-vis de l'éthylène (Goren, 1993). A ce stade les auxines empêchent la synthèse des enzymes hydrolitiques (Racskó *et al.*, 2006). En revanche, une longue exposition à l'éthylène contribue à l'inhibition du transport des auxines des feuilles et des tiges vers la zone AZ-C et à la destruction des auxines déjà en place. Consécutivement les cellules deviennent sensibles au signal envoyé par l'éthylène, les enzymes d'hydrolyse rentrent en action et la FDF (Force de Détachement du Fruit) commence à diminuer (Goren, 1993). Une fois le processus déclenché, les auxines ne jouent plus un rôle d'inhibiteur mais plutôt celui d'un accélérateur qui promeut la synthèse de l'éthylène (Sexton et Roberts, 1982). L'interaction entre ces deux hormones conduit donc soit à la stimulation ou soit à l'inhibition de l'abscission selon leurs concentrations et selon le stade du processus (Goren, 1993).

Le rôle de l'acide abscissique est principalement lié à la sénescence (Del Rio *et al.*, 1998). Il n'a pas un effet direct sur l'abscission et n'a qu'un rôle intermédiaire au cours de ce phénomène (Roberts *et al.*, 2002). Sa concentration augmente au cours de la maturation et avant la chute des fruits matures conduisant à l'arrêt de la croissance et la sénescence suivie par l'abscission des fruits (Ladanyia, 2008). La concentration de cette hormone est beaucoup plus élevée chez les fruits des variétés d'oranger précoces et de mi-saison que chez les variétés tardives (Rasmussen, 1975). L'ABA limite le transport des auxines et semble être impliquée dans la synthèse d'éthylène et de certains enzymes (Racskó *et al.*, 2006). Cependant, la balance hormonale entre l'ABA et les auxines peut moduler le taux d'abscission des fruits. Pendant la période de récolte, les fruits perdent leur sensibilité aux agents chimiques inducteurs d'abscission en raison de concentrations élevées en auxines et des concentrations faibles en ABA (Yuan *et al.*, 2001). L'action de l'ABA dépend donc de son interaction avec les auxines (Patterson, 2001).

Les cytokinines ont un double effet sur l'abscission. En effet, bien que des concentrations élevées en cytokinines inhibent l'abscission (Pierik et Abbadi, 1972), elles sont plutôt considérées comme stimulatrices de l'abscission (Sipes et Einset, 1983).

Les gibbérellines (GAs) sont des hormones inhibitrices de l'abscission (Ladanyia, 2008). D'autres hormones ont aussi un rôle inhibiteur comme l'acide salicylique. Les signaux de cette hormone sont antagonistes à ceux de l'éthylène en contrôlant négativement l'expression des gènes régulés par l'éthylène et pouvant même bloquer la biosynthèse de cette dernière

(Sayegh, 2009). L'activité enzymatique de la cellulase, *EC 3.2.1.4* n'augmente pas chez les plantes traitées par l'acide salicylique contrairement aux plantes non traitées (Ferrarese *et al.*, 1996).

### **3.5.3. Implication des sucres et des acides dans le phénomène d'abscission**

Généralement, il est admis que l'abscission se situe chronologiquement entre la fin de la phase de maturation et le début de la phase de sénescence (Racskó *et al.*, 2006). Au cours de cette période transitoire, de nombreuses réactions chimiques et biochimiques ont lieu. Il est ainsi probable que les sucres et les acides organiques, dont l'évolution est très dynamique tout au long de la maturation, pourraient avoir un rôle dans l'abscission. Wilson et Hendershott (1968) ont montré que les sucres pourraient être impliqués dans le processus d'abscission. Comme pour les hormones, il y a des sucres qui retardent l'abscission et d'autres qui l'accélèrent. Les sucres majoritairement présents dans les fruits d'agrumes (le saccharose, le fructose et le glucose) retardent l'abscission, le mannitol, un sucre polyol (sucre-alcool), favorise la chute des fruits alors que le sorbitol et l'inositol ne présentent aucun effet sur l'abscission.

Selon Addicott (1982), les sucres exercent parfois un effet de nature hormonale. Des expérimentations conduites sur les plantes d'haricot montrent que l'application de glucose, de fructose, de saccharose (Osborne, 1959) d'arabinose, de mannitol ou de rhamnose (Morre, 1968) retarde l'abscission. Quant-au galactose, monosaccharide présent en faibles quantités dans les fruits d'agrumes (Füzfai et Molnár-Perl, 2007) il stimule l'abscission (Colclasure et Yopp, 1976 ; Addicott, 1982). Ce sucre influence probablement la chute via un mécanisme d'induction de pectinase (Addicott, 1982).

Généralement, le manque des carbohydrates favorise la chute des fruits (Gómez-Cadenas *et al.*, 2000). En fait, en réponse à la diminution des concentrations en sucres (Saccharose et glucose) suite à une défoliation (Mehouachi *et al.*, 1995 ; Estornell *et al.*, 2013) ou à une forte compétition entre les fruits et les pousses végétatives (Racskó *et al.*, 2007), les concentrations d'ABA augmentent et par conséquent les concentrations d'ACC aussi. L'ACC est métabolisé en éthylène dont l'effet se traduit par la chute des fruits (Estornell *et al.*, 2013).

D'un autre côté, si les carbohydrates sont disponibles en quantités suffisantes, l'abscission des fruits pourrait être retardée (Mahouachi *et al.*, 2009).

La plupart des acides organiques interviennent dans le phénomène d'abscission (Cooper et Henry, 1968). Plusieurs travaux suggèrent que l'acide ascorbique seul ou en combinaison avec l'acide citrique contribue à la chute des fruits matures. C'est pourquoi, les entreprises Floridiennes utilisent des composés chimiques à base d'acide ascorbique et ou d'acide

citrique (2 à 5 %) pour diminuer la force de détachement des fruits pour faciliter ainsi la récolte mécanique (Hulme, 1971).

#### **3.5.4. Contrôle génétique**

Les études d'expression génique ont montré que de nombreux gènes s'expriment spécifiquement dans les zones d'abscission et de façon plus importante au cours de l'abscission. Les régions promotrices des gènes constituent un lieu privilégié au niveau duquel peut s'exercer la régulation de l'expression. Un certain nombre de promoteurs abscission spécifiques ont été identifiés à partir de données d'expression (Hommel, 2007).

L'abscission met en relation plusieurs gènes qui codent pour différentes protéines telles que les hormones, les enzymes... Plus de 4500 EST (Expressed Sequence Tagged) associés à l'abscission des oranges, des clémentines et des mandarines ont été détectées et représentent 3720 uni gènes (Terol *et al.*, 2007). Parmi eux, plus de 500 uni gènes sont exprimés dans les zones d'abscission actives (Agustí *et al.*, 2007).

##### **3.5.4.1. Gènes codant pour les enzymes hydrolytiques**

L'activation des zones AZs est caractérisée par un enrichissement du cytoplasme cellulaire en polysomes, dictyosomes, appareil de golgi...(Bonghi *et al.*, 2000). Au même stade, une surexpression de gènes codant pour des récepteurs RLKs («receptor like protein kinase»), des enzymes hydrolytiques, ont été mis en évidence. Ce changement dans la composition des cellules et dans l'expression génique se traduit par une activité cellulaire intense associée à une production importante d'enzymes dont le rôle est la dégradation des parois cellulaire des zones AZs (Estornell *et al.*, 2013). L'expression des gènes codant pour la cellulase, la pectine-méthylésterase, la polygalacturonase est fortement corrélée avec la diminution de la force de détachement du fruit (Huberman et Goren, 1979).

##### **3.5.4.1.1. Cellulases ou Endo-1,4- $\beta$ -glucanases ou EC 3.2.1.4I**

En réponse à l'augmentation de la concentration d'éthylène et d'ABA au cours de la maturation, l'activité enzymatique de la cellulase augmente considérablement (Rasmussen, 1975; Roberts *et al.*, 2002; Tadeo *et al.*, 2008). Wu et Burns (2004) ont isolé chez l'oranger deux gènes *Cel a1* et *Cel b1* codant pour la cellulase au niveau de la zone d'abscission AZ-C. L'expression du gène *Cel-bl* montre une augmentation modérée et continue entre 4 et 40 h après l'application de l'éthylène alors que l'expression du gène *Cel-a1* augmente fortement 24h après le traitement. Deux pics d'activité cellulase, ont été mesurés au niveau du calice du fruit. Le pic majeur se caractérise par un point isoélectrique (pI) de 8 et un point isoélectrique de 5.5 pour le pic mineur. Le pic majeur correspond à l'activité de *Cel a1* tandis que le pic mineur

correspond à l'activité de *Cel b1*. La différence dans les modèles d'accumulation des ARNm au niveau du calice suggère que chaque cellulase a une fonction distincte durant le phénomène d'abscission (Kazokas et Burns, 1998). *Cel a1* code pour une cellulase acide et *Cel b1* code pour une cellulase basique. Il y a une forte probabilité qu'il existe d'autres cellulases dont les pIs sont similaires à ceux de *Cel a1* et *Cel b1*. Les analyses de séquence des gènes codant pour la cellulase montrent que tous les clones sont des copies de ces deux gènes. Le nombre d'iso-formes varie entre les espèces et entre les variétés d'une même espèce (Bonghi *et al.*, 2000). Kossuth et Biggs (1977) ont mis en évidence la présence de 9 iso-formes de cellulase au niveau de la zone d'abscission chez l'orange Valencia et Goren et Huberman (1976) décrivent l'implication de trois Cel-isoenzymes dans l'abscission parmi sept iso-enzymes détectées au niveau de la zone AZ-C de l'orange Shamouti.

#### **3.5.4.1.2. Polygalacturonases (EC 3.2.1.15)**

Une corrélation entre la disjonction cellulaire et l'augmentation de l'activité de polygalacturonase a été observée une première fois chez les fruits au cours de la maturation (Huber, 1983). Plus récemment, une autre étude a démontré l'implication de la PG dans la chute des fruits (Roberts *et al.*, 2002). Il est à noter que des travaux réalisés sur la tomate ont démontré que les gènes de polygalacturonase impliqués dans le ramollissement des fruits au cours de la maturation sont différents de ceux exprimés au cours de l'abscission (Taylor *et al.*, 1991). Bien que chez le pêcher et chez le pommier le gène codant pour cette enzyme soit exprimé bien avant celui de la cellulase, chez les agrumes l'expression des deux gènes est concomitante (Bonghi *et al.*, 2000).

Chez la tomate, trois iso-formes de PG ; *TAPG1*, *TAPG2* et *TAPG4* sont associées à l'abscission. En revanche chez *Arabidopsis thaliana*, plus de 75 gènes PG ont été détectés (Roberts *et al.*, 2000). *PGAZAT* fait partie du groupe des gènes codant pour des PG. L'activité de *PGAZAT* contribue au moment du déclenchement de l'abscission. Cependant, il faut noter que ce gène n'est pas le seul à avoir ce rôle. D'autres gènes de la même famille de PG sont probablement impliqués dans la dissolution de la lamelle moyenne avec l'ensemble des gènes codant pour les autres enzymes (Roberts *et al.*, 2002). Chez les agrumes, Wu et Burns (2000) ont identifié deux gènes de polygalacturonases (*PGI* et *PGIII*) au niveau des AZs des fruits traités par le CMNP (5-chloro-3-méthyl-4-nitro-1H-pyrazole), agent chimique inducteur d'abscission. Leurs expressions ont été détectées 24 h après l'application de CMNP. Cette expression ensuite augmentait de façon très importante 48 à 72 h plus tard.

#### **3.5.4.1.3. Pectine-méthyl-estérase**

Chez les agrumes, les pectine-méthyl-estérases (PME) jouent un rôle primordial dans la dégradation des parois cellulaires lors de l'abscission. Le rôle de cette enzyme consiste principalement à favoriser la séparation cellulaire en facilitant « l'accès » à la lamelle moyenne des autres enzymes hydrolytiques, telles les polygalacturonases (Ratner *et al.*, 1969). Ceci se fait par la dégradation de la lamelle moyenne composée principalement de pectines qui sont elles-mêmes constituées de polymères d'homogalacturonanes fortement méthylstérifiées. La pectine-méthyl-estérase catalyse ainsi la déméthylstérification (Lee *et al.*, 2008). Cette enzyme est codée par au moins deux groupes de gènes: les deux gènes du groupe I, *CsPME1* et *CsPME2* et le gène *CsPME3* du groupe II. Il a été observé que la quantité d'ARNm produits par les deux groupes de gènes au niveau des zones d'abscission augmente considérablement suite à l'induction par l'éthylène (Joseph Naim *et al.*, 1998). Ceci laisse supposer que ces gènes de PME sont clairement impliqués dans le phénomène d'abscission. Les différents modèles d'expression des deux groupes de gènes suggèrent que chacun des groupes possède un rôle spécifique. En effet, l'accumulation de l'ARNm des gènes PME du groupe I au niveau des jeunes tissus montre qu'ils sont impliqués dans le processus de croissance. En revanche, l'augmentation de l'activité de *CsPME3* au niveau des feuilles et des fruits traités à l'éthylène montre que ce gène intervient dans la dégradation de la paroi cellulaire localisée au niveau de la zone AZ-C au cours de l'abscission (Joseph Naim *et al.*, 1998).

#### **3.5.4.1.4. $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal, EC 3.2.1.23)**

La  $\beta$ -galactosidase hydrolyse les résidus de galactosyl issus de nombreux polymères des carbohydrates, des glycoprotéines et des galactolipides (Smith *et al.*, 2002). Au cours du développement du fruit, quels que soient les agrumes, l'expression du gène codant pour cette enzyme augmente (Ali *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2002) dans différents tissus du fruit telles que la peau et les vésicules à jus (Burns et Baldwin, 1994). Ce gène a été détecté pour la première fois chez les agrumes par Wu et Burns (2004) suite à une application séparée de CMNP et d'éthéphon (inducteurs chimiques d'abscission). Ce gène s'exprime en même temps que les gènes codant pour la cellulase, la polygalcturonase et la pectine-méthyl-estérase. La dégradation de la lamelle moyenne de la zone AZ résulte ainsi d'une forte coordination entre ces différentes enzymes. D'autres gènes qui ressemblent au  $\beta$ -gal ont également été détectés chez les fruits de l'orange Valencia (Wu et Burns, 2004).

#### **3.5.4.2. Gènes codant pour les hormones d'abscission**

L'éthylène est un activateur final de l'abscission. Deux systèmes de production d'éthylène ont été définis. Le système I est fonctionnel pendant le développement et la croissance en condition témoin mais également en conditions de stress. Le système II quant à lui se met en place pendant la sénescence des fleurs et la maturation des fruits (Barry et Giovannoni, 2007).

La biosynthèse d'éthylène débute par la conversion de la méthionine, précurseur biologique majeur de l'éthylène, en S-adenosyl méthionine (SAM). Cette réaction est catalysée par l'enzyme SAM synthétase. La SAM est métabolisée en 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique sous l'action de l'enzyme ACC synthase (ACS). L'ACC est ensuite oxydé en éthylène par l'ACC oxydase. L'ACO est codée par le gène *CsACO1* (Katz *et al.*, 2004). Il a été rapporté que l'étape limitante de la synthèse d'éthylène est celle de la conversion du SAM en ACC sous l'action d'ACS (Kende, 1993). Cette dernière est codée par une famille multi génique. Il existe différents iso-formes dont l'expression est fortement régulée par une grande variété de signaux. Chez la tomate, au moins huit gènes ACS ont été identifiés dont *ACS1A*, *ACS1B* et *ACS2-7* (Shiu *et al.*, 1998).

L'application de CMNP chez les agrumes stimule la chute des fruits via l'activation de la production d'éthylène. Cette stimulation chimique induit l'expression de plusieurs gènes (*ACS1*, *ACS2* et *ACO*) responsables de la biosynthèse d'éthylène dans la peau du fruit, au niveau du calice et de la zone AZ-C (Yuan *et al.*, 2005).

L'éthylène synthétisé est ensuite perçu par des récepteurs membranaires, ceci étant nécessaire pour la transmission du signal hormonal (Bleecker et Schaller, 1996).

L'analyse de mutants d'*Arabidopsis thaliana* a permis de comprendre les mécanismes moléculaires de l'action de l'éthylène. Chez cette plante, la perception et la transduction du signal éthylénique sont sous le contrôle de plusieurs gènes codant pour différents types de récepteurs tels que, *ETR1*, *ERS1*, *ETR2*, *EIN4*, *ERS2*. Ces récepteurs sont constitués d'une protéine senseur et d'une protéine régulatrice de la réponse à l'éthylène, les deux fonctionnant conjointement. Le système est constitué d'un « domaine histidine » au rôle senseur, qui auto-phosphoryle une histidine interne en réponse au signal, et d'un « domaine récepteur » qui active des composés situés plus en aval dans la cascade du signal (Chang *et al.*, 1993; Wurgler-Murphy et Saito, 1997).

Les récepteurs de l'éthylène sont subdivisés en deux sous-familles (1et 2). La sous famille 1 regroupe les récepteurs qui contiennent les cinq domaines fonctionnels



caractéristiques des protéines du type histidine-kinase (His-kinase). La sous-famille 2 rassemble les récepteurs qui contiennent seulement un ou deux de ces domaines (Bleecker et Schaller, 1996; Hall *et al.*, 2000).

Les récepteurs sont tous des régulateurs négatifs du signal de l'éthylène et leur activité est inhibée par la fixation de la molécule d'éthylène. Plus il y a de récepteurs, plus il faut d'éthylène pour les inactiver et donc moins la plante est sensible à l'éthylène (Cancel et Larsen, 2002). Les récepteurs peuvent activer une protéine appelée Constitutive Triple Réponse 1 (CTR1), avec une activité Ser/Thr kinase qui est aussi un régulateur négatif de la transduction du signal (Alexander et Grierson, 2002). L'union de l'éthylène avec son récepteur inactive CRT1 qui devient incapable de bloquer la voie de transduction, d'où l'activation de la voie de signalisation de l'éthylène (Bleecker, 1998).

Chez les mandarines, des gènes codants pour des récepteurs d'éthylène de type I à savoir *CsETR1* et *CsERS1* et de type II, *CsETR2* et *CsETR3*, ont été détectés suite à l'application d'éthylène exogène (Fujii *et al.*, 2007). Dans cette étude, *ETR2* était associé à la faible sensibilité à l'éthylène des fruits matures (Fujii *et al.*, 2007). Les mêmes séquences nucléotidiques d'éthylène response sensor-1 (*CsERS1*), d'éthylène response-1 (*CsETR1*), 2 (*CsETR2*), 3 (*CsETR3*), de constitutive triple response-1 (*CsCTR1*), d'éthylène insensitive-2 (*CsEIN2*) et d'éthylène insensitive 3-like-1 (*CsEIL1*) et 2 (*CsEIL2*) ont été observées chez l'oranger Valencia. L'application d'éthylène, un agent chimique induisant l'abscission, a provoqué une augmentation considérable de l'expression des gènes *CsETR2* et *CsERS1*. Il est à noter que les interactions entre les récepteurs de type I et *CsCTR1* sont plus fortes que les interactions entre les récepteurs de type II et *CsCTR1*. Ceci démontre l'importance du rôle des récepteurs de type I dans la signalisation d'éthylène (John-Karuppiah et Burns, 2010).

Plusieurs gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des auxines (IAA amino acide hydrolase, IAA glycosyltransferase et GH3-like) présentent une forte expression au niveau du calice du fruit. L'expression de ces gènes augmente considérablement au moment de l'activation du phénomène d'abscission chez les agrumes (Li *et al.*, 2003 ; Lahey *et al.*, 2004). Les transporteurs des auxines sont également impliqués dans le phénomène d'abscission. La prévention de la chute des fruits exige un transport constant et continu d'auxines vers les zones AZs. Chez *Arabidopsis thaliana*, ces transporteurs sont codés par différents gènes tels que *AtPIN1*, *AtPIN3*, *AtPIN7*, *AtLAX1*, *AtLAX2*, etc.... (Dal Cin *et al.*, 2009).

La synthèse d'ABA est codée par plusieurs gènes appartenant à la famille *NCED* (*NCED1*, *NCED2*, *NCED3*...) (Rodrigo *et al.*, 2006). L'accumulation d'ABA dans les racines induite par un déficit hydrique est due principalement à l'augmentation de l'expression de *CsNCED3*, gène clé dans la régulation de la synthèse d'ABA dans les conditions de sécheresse (Agustí *et al.*, 2007). L'augmentation de l'expression d'ABA déclenche la synthèse d'éthylène et par conséquent la mise en route des mécanismes d'abscission (Iglesias *et al.*, 2007).

### **3.6. Dernière étape de l'abscission : la Post- abscission**

Après la chute des fruits, les zones d'abscission sont des voies d'entrée pour les pathogènes. C'est pourquoi, d'autres processus physiologiques et moléculaires se mettent en place pour limiter ce problème (Sexton et Roberts, 1982). L'abscission est suivie ainsi par une formation d'une couche protectrice tout au long de la zone d'abscission. En effet, la disjonction cellulaire déclenche une modification dans la morphologie des parois cellulaires qui se traduit par le dépôt de subérine, de lignine et parfois même de callose. Ces substances sont déposées durant et après l'abscission (Niederhuth *et al.*, 2013). Cette étape représente donc la dernière phase d'abscission (Estornell *et al.*, 2013; Niederhuth *et al.*, 2013).

### **3.7. L'abscission est-elle un critère recherché ?**

Placée dans un contexte agronomique, l'abscission des fruits peut être selon les situations, attendue ou non désirée (Niederhuth *et al.*, 2013). Ceci dépend surtout des objectifs de l'agriculteur et des périodes physiologiques pendant lesquelles la chute des fruits se produit. En effet, si l'agriculteur veut faire un éclaircissage (Davis *et al.*, 2004) ou mécaniser la récolte (Burns *et al.*, 2005), il utilise les produits chimiques qui favorisent la chute des fruits ; cependant si l'agriculteur veut minimiser les pertes des rendements dues à la chute des fruits, il utilise les agents chimiques qui empêchent ou retardent l'abscission (Cooper et Henry, 1973).

#### **3.7.1. Mécanisation de la récolte: l'abscission peut être un critère agronomique recherché !**

Encore très récemment en Floride, deuxième région productrice de jus d'orange dans le monde, les récoltes se faisaient manuellement. Le coût de la récolte dépasse souvent le coût de la production. Bien que la mécanisation de la récolte puisse diminuer considérablement les coûts (par deux, voire par trois), les vergers récoltés mécaniquement représentent moins de 4 % de la totalité des superficies récoltées (Roka *et al.*, 2009).

### **3.7.1.1. Développement de la récolte mécanique**

Les premiers efforts entrepris pour développer les méthodes de récolte mécanique ont eu lieu à la fin des années 1950 en Floride. Les premiers résultats ont montré une perte excessive du rendement du fait de l'arrachage de la peau des fruits ou de la nécessité d'un autre passage de récolte par les ouvriers pour récolter les fruits restants sur l'arbre. Par conséquent, l'utilisation d'un agent chimique d'abscission a été rapidement reconnu comme indispensable pour la récolte mécanique. Au début des années 1990, il n'y avait qu'une seule entreprise qui pratiquait la récolte mécanique. Neuf ans plus tard, plusieurs entreprises ont adopté ce mode de récolte. Les superficies récoltées mécaniquement sont passées de 6,5 ha en 1999 à 35 000 ha en 2006/2007 (Roka *et al.*, 2009).



**Figure 15.** Récolte mécanique des agrumes à Floride (Etats-Unis)

La mécanisation ne s'est développée que très progressivement. Ceci est dû aux dommages causés aux arbres par ce mode de récolte ainsi qu'à la diminution du rendement l'année suivante chez certaines variétés. Cette alternance est très marquée chez les variétés tardives dont les fruits matures « cohabitent » avec des petits fruits verts issus de la nouvelle floraison (exemple : orange Valencia). Le recours à des agents chimiques d'abscission est devenu de plus en plus nécessaire pour développer la mécanisation de la récolte. Avec la découverte de l'implication de l'éthylène dans le phénomène d'abscission par (Wilson et Hendershott, 1968), plusieurs programmes de recherches ont été mis en place. En 2004, il a été mis en évidence que le CMNP (5-chloro-3-méthyl-4-nitro-1*H*-pyrazole) était l'agent chimique d'abscission le plus efficace. Grâce à ce produit, la mécanisation de la récolte des variétés tardives est devenue possible, la vitesse de la récolte mécanique et le taux de recouvrement (le

volume de l'arbre récolté par rapport au volume total) de l'arbre ont fortement augmenté et les dommages causés sur les arbres ont diminué (Ziaf *et al.*, 2004).

### **3.7.1.2. Limites et contraintes de la récolte mécanique**

Bien que ces composés chimiques aient contribué énormément à l'amélioration des techniques de récolte mécanique des agrumes, il a été démontré que tous ces composés possèdent leur lot d'inconvénients. En effet, leur application pourrait être accompagnée par des niveaux variés de phytotoxicité, une chute importante des feuilles, une diminution des échanges gazeux et une baisse dans le rendement photosynthétique... Les recherches se poursuivent pour trouver d'autres composés chimiques à la fois plus efficaces et plus respectueux de l'environnement (Li *et al.*, 2008).

### **3.7.2. Preharvest drop : l'abscission est un critère non recherché**

L'abscission des fruits matures est un phénomène naturel qui assure la longévité et la dispersion de l'espèce via la dispersion des pépins (Estornell *et al.*, 2013). Les fruits chutent tout au long de la phase de maturation. Cependant, dans certaines régions productrices d'agrumes, la chute des fruits s'accroît à l'approche de la maturité (Figure 16). Cette vague d'abscission engendre dans certains cas des pertes économiques très importantes (Racsó *et al.*, 2006). Cette chute précoce pourrait être due à plusieurs facteurs. Sous certaines conditions environnementales « adverses », la chute précoce des fruits est courante (Iglesias *et al.*, 2007). En l'occurrence, elle est plus importante pendant les hivers frais et humides. L'abscission avant la récolte est due également à la diminution des concentrations en auxines dans les fruits (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996). Selon les variétés, la chute pourrait être plus ou moins importante. En effet, bien que ce phénomène se produise chez plusieurs variétés, d'autres variétés semblent être insensibles à la chute même pour les fruits qui ont dépassé le stade de maturité « overripe » (Iglesias *et al.*, 2007). Estornell *et al.* (2013) ont montré que les variétés d'oranger précoces et de mi-saison sont plus sujettes à la chute avant récolte que les variétés tardives. Chez ces dernières la diminution de la force de détachement du fruit est retardée au cours de la maturation. Le fruit reste plus longtemps sur l'arbre. C'est la raison pour laquelle les agriculteurs et les industriels s'intéressent davantage aux variétés tardives.



**Figure 16.** Abscission des fruits des agrumes chez les clémentines et les oranges

### ***3.7.3. L'abscission est un critère à contrôler !***

Pour augmenter les profits en favorisant la récolte mécanique et diminuer les pertes économiques en minimisant les pertes dues aux chutes précoces des fruits, il est nécessaire de maîtriser ce phénomène. L'abscission est ainsi un paramètre de production à contrôler !

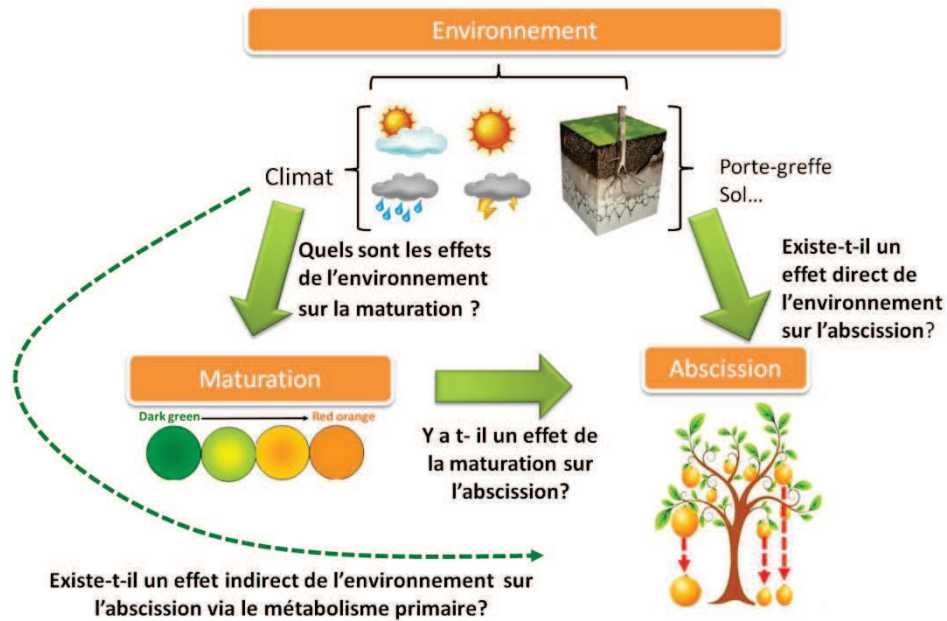
Cela passe obligatoirement par une meilleure compréhension des mécanismes de l'abscission et de la maturation des agrumes. C'est pourquoi, des études physiologiques et génétiques de ces deux processus devraient nous aider à mieux les comprendre afin de proposer des alternatives agronomiques et participer au développement du secteur agrumicole.

#### **4. Objectifs de la thèse**

L'analyse du processus d'élaboration de la qualité des fruits et celui de l'abscission ainsi que leurs interactions sont des préalables pour nos schémas d'amélioration variétale. *In fine*, un contrôle de la qualité de production est escompté en sélectionnant les génotypes aux phénotypes souhaités sur la période souhaitée. Pour cela il est nécessaire de rechercher les déterminants génétiques associés aux caractères étudiés et de vérifier si les paramètres environnementaux peuvent modifier leur expression. Les objectifs de ce travail sont les suivants:

1. Evaluer les effets des conditions de culture ou de l'environnement sur l'abscission massive des fruits au cours de la maturation du fruit en disposant d'un essai multi-sites Corse-Espagne-Tunisie. Trois sous objectifs principaux peuvent être cités:

- Caractériser les environnements et trouver les facteurs les plus influents sur la variation de la qualité et de la chute massive des fruits.
- Déterminer une éventuelle relation de cause à effet entre la chute des fruits et la variation de divers paramètres physico-chimiques du fruit, incluant la force d'attachement du fruit au pédoncule.
- Vérifier si la force d'attachement du fruit au pédoncule ou son corolaire, la Force de Détachement du Fruit (FDF), est un indicateur efficace du démarrage ou du développement du processus d'abscission.



**Figure 17.** Résumé des objectifs de l'étude menée sur l'abscission et la maturation

2. Etudier l'hérédité de différents caractères physico-chimiques liés à la qualité des fruits mais également à la FDF sur une période où les fruits d'une population ségrégeante sont en phase de maturation. Quatre sous-objectifs principaux peuvent être cités :

- Analyser au cours de la phase de maturation la variation de différents caractères physico-chimiques liés à la qualité des fruits mais également à la FDF, dans la descendance d'un croisement de type « backcross » entre deux cultivars, donc génétiquement proches, mais aux phénotypes divergents.
- Evaluer l'héritabilité des caractères et les corrélations entre paramètres physico-chimiques du fruit.
- Réaliser une carte génétique de chacun des deux génomes parentaux et analyser l'effet du type de croisement « backcross » sur la colinéarité et la distance entre marqueurs ainsi que sur la fréquence et la position des distorsions de ségrégation.
- Etudier les QTL associées aux différents caractères de la qualité du fruit en analysant leur nombre, leur position sur la carte génétique, leur effet sur la variation phénotypique et leur stabilité à différentes dates au cours de la maturation et sur plusieurs années.

## ***Matériel et Méthodes***

---

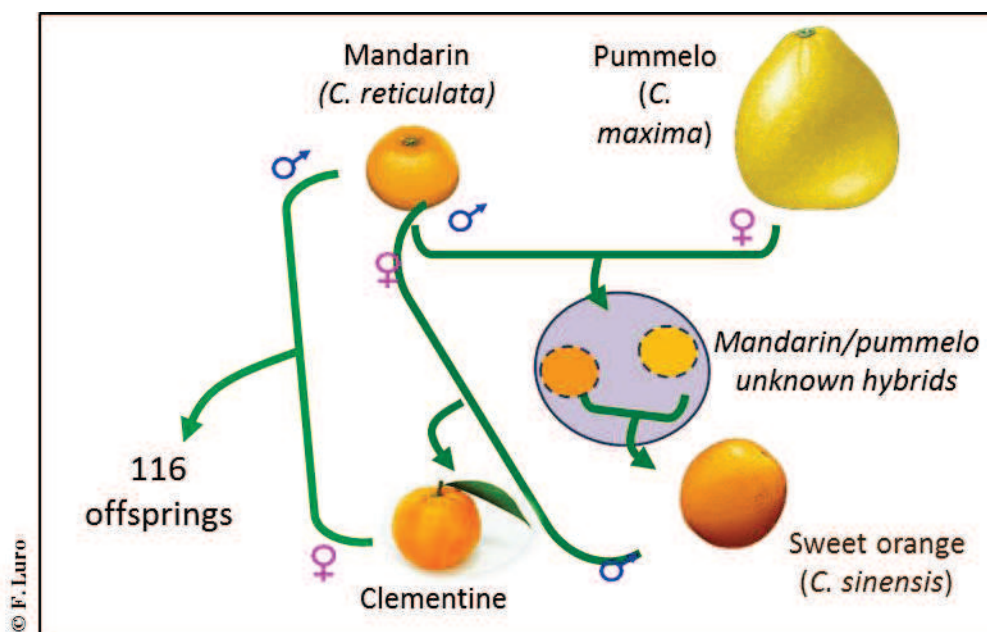


## **1. Dispositifs expérimentaux et Matériel végétal**

### **1.1. Premier dispositif expérimental**

#### **1.1.1. Site expérimental et Matériel végétal**

Pour étudier l'hérédité des principaux paramètres de la qualité des fruits nous avons choisi de travailler sur une population d'hybrides issue d'un croisement entre le clémentinier Commun (SRA 63, *Citrus deliciosa* × *C. sinensis*) et le mandarinier Willow Leaf, (*C. deliciosa*). Cette population a servi également à l'étude des relations entre les processus de maturation (à travers l'évolution et les valeurs des caractères de la qualité des fruits) et d'abscission. Le choix de ce croisement repose sur des différences phénotypiques de la qualité des fruits et sur l'époque de maturité commerciale: la clémentine est mûre en novembre et son acidité décline vite, ses fruits sont de forme ronde et apyrènes en vergers monoclonaux, la coloration de sa peau est d'un orange foncé tandis que la mandarine est de forme aplatie, contient de nombreux pépins, une acidité qui demeure plus élevée, une maturité atteinte en janvier et une peau de couleur jaune orangé (Figure 20). Par ailleurs, la clémentine est un hybride naturel d'une mandarine (*C. deliciosa*) et d'un oranger qui lui-même découlerait d'un croisement entre deux hybrides interspécifiques (mandarine × pamplemousse) (Wu *et al.*, 2014). Si l'hétérozygotie élevée de la clémentine s'explique par son pédigrée, celle de la mandarine est plus surprenante bien que les travaux de séquençage des génomes aient permis de découvrir une introgression dans son génome de fragments chromosomiques de pamplemoussier (Wu *et al.*, 2014) (Figure 18). La combinaison de ces informations nous laisse espérer une hétérozygotie des locus chez l'un ou les deux parents et donc une ségrégation des caractères. On peut ajouter aussi comme raisons de ce choix des parents, l'utilisation fréquente du clémentinier et des mandariniers dans les programmes de création variétale pour générer des petits agrumes destinés au commerce du fruit frais (Ollitrault *et al.*, 2008). Enfin, le clémentinier est auto-incompatible et ses graines sont monoembryonnées, facilitant ainsi l'obtention de population d'hybrides lorsqu'il est utilisé en tant que parent maternel.



**Figure 18.** Origine phylogénétique de la population Clémentinier x mandarinier

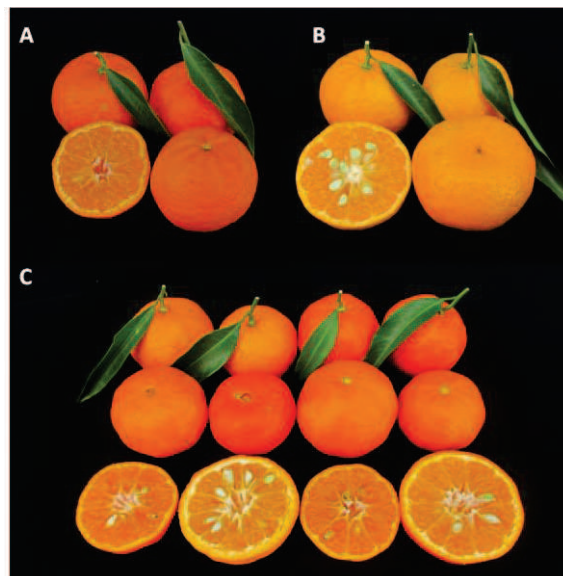
La population est cultivée en plein champ sur le site de la station de recherche agronomique INRA-CIRAD de San Giuliano, Corse (42°18 Nord, 9°29 Est). Elle est constituée de 116 hybrides plus les deux parents. Les arbres de la population sont greffés sur le même porte-greffe, le citrange Carrizo. Ils ont été plantés en 1997, sur la même parcelle expérimentale orientée Nord-Sud (Figure19). Chaque arbre représente un génotype différent. Ces arbres sont au stade adulte de leur production fruitière. Ils sont espacés de 4 m. La parcelle est irriguée lors de la période sèche, l'été. Les arbres sont indemnes de maladies et soumis aux mêmes conditions culturales (traitements, fertilisation...) et n'ont pas été taillés pour éviter l'introduction d'effets sur la grosseur du fruit.



**Figure 19.** Parcelle expérimentale à l'Inra San Giuliano regroupant les populations d'hybrides utilisées pour les études génétiques

### **1.1.2. Prélèvement et échantillonnage**

L'étude sur la population a été effectuée au cours de deux campagnes successives de production 2011/2012 et 2012/2013. Pendant la première campagne, quatre prélèvements ont été faits sur une période de cinq mois allant d'octobre jusqu'en février. Le premier, le deuxième, le troisième et le quatrième prélèvement ont été réalisés respectivement début octobre, début novembre, début janvier et début février. En ce qui concerne la deuxième campagne, nous avons procédé de la même manière mais nous nous sommes limités à trois prélèvements qui ont eu lieu en octobre, décembre et février.



**Figure 20.** Echantillons des fruits des deux parents (A: Clémentines et B: mandarines) et des hybrides de la population clémentine × mandarine (C)

La cueillette des fruits a été faite par temps sec et les fruits ont été prélevés sur le pourtour de l'arbre à raison de 10 fruits par arbre. Des feuilles ont été également prélevées pour faire les analyses moléculaires nécessaires à la cartographie génétique.

## **1.2. Deuxième dispositif expérimental**

### **1.2.1. Matériel végétal**

Pendant la campagne 2011/2012, le suivi des caractères de la qualité des fruits au cours de la maturation et de l'abscission n'a pas été fait que sur la population d'hybrides mais aussi sur neuf cultivars d'orangers. Les oranges sont particulièrement exposées à la chute massive prématurée par rapport à la date de récolte, dans les pays au sud et à l'ouest de la

Méditerranée. Nous nous sommes donc intéressés à l'analyse des conditions physiologiques conduisant à cette chute brutale des fruits.

Afin de maximiser les chances de détection d'un effet d'un caractère de la qualité des fruits fluctuant au cours de la maturation nous avons choisi des cultivars ayant des périodes de maturité différentes: 3 variétés précoces novembre - décembre (Salustiana, Navelina, Hamlin), trois variétés de mi-saison, janvier - février (Washington navel, Shamouti, Moro) et trois variétés tardives dont la période de maturité commerciale se situe entre mars et avril (Navelate, Valencia late, Maltaise blonde).

### ***1.2.2. Prélèvement et échantillonnage***

Six prélèvements de fruits ont été réalisés au cours de la maturation. La période du suivi s'est étalée sur six mois et demi environ allant de décembre jusqu'au début juillet. Les prélèvements ont eu lieu le 20/12/2011, le 30/01/2012, le 20/02/2012, le 26/03/2012, le 31/05/2012 et le 01/07/2012. Les fruits ont été cueillis à l'extérieur de la frondaison et dans les quatre orientations (Est, Ouest, Nord, Sud) pour minimiser les effets dus aux microclimats.

## ***1.3. Troisième dispositif expérimental***

### ***1.3.1. Site expérimental***

La maturation chez les agrumes est un phénomène fortement dépendant des facteurs environnementaux. Pour caractériser ces effets environnementaux, une étude multi-site a été conduite au cours de la campagne 2012/2013 sur trois sites localisés en France, Espagne, et en Tunisie. Les sites expérimentaux sont situés à : l'INRA-CIRAD San Giuliano (Corse), à l'IVIA Valence (Instituto Valenciano de investigaciones Agrarias) (Espagne) et à l'INAT (Institut National Agronomique de Tunisie) (Tunisie). Il est à noter que la Corse, l'Espagne et la Tunisie sont situées respectivement au niveau des 42<sup>ème</sup>, 39<sup>ème</sup> et 34<sup>ème</sup> parallèles de latitude Nord.

Les trois pays ont un climat méditerranéen c'est-à-dire un été sec qui impose l'irrigation pour la culture des agrumes. Cependant, malgré cette empreinte méditerranéenne commune, les conditions environnementales diffèrent de manière importante entre les 3 sites. Les étés sont plus chauds et plus secs au sud de la méditerranée et les hivers sont plus froids au nord. La Corse représente la limite géographique nord de la culture des agrumes. Par ailleurs, les sols sont de nature physico-chimique très différente: en Corse il est argilo-limoneux à pH acide, en Tunisie et en Espagne il est sablo-limoneux.

### 1.3.2. Matériel végétal

Le choix des variétés a été effectué en fonction de la période de maturité et de la disponibilité des génotypes sur les trois sites. Six orangers greffés sur citrange Carrizo ont fait l'objet de cette étude en Corse. Il s'agit de deux cultivars précoces (Navelina et Newhall Navel), deux cultivars de saison (Washington Navel, Maltaise demi sanguine) et de deux cultivars tardifs (Lane late et Navelate). A Valence, trois cultivars sont en commun avec le site expérimental Corse (un de chaque groupe) ont fait l'objet de cette étude. Il s'agit de Navelina, de Washington Navel et de Navelate. En Tunisie, cinq cultivars sont communs à l'étude réalisée à la station de Corse: Navelina, Newhall Navel, Maltaise demi-sanguine, Washington Navel et Lane late. Contrairement à l'Espagne et à la Corse dont les variétés sont greffées sur le citrange Carrizo, en Tunisie les variétés étudiées étaient greffées sur le bigaradier (*Citrus aurantium*). C'est le porte-greffe le plus utilisé pour la culture des agrumes en Tunisie. Malgré l'absence de mêmes combinaisons sur tous les sites, nous avons considéré que le porte-greffe fait partie de l'environnement, au même titre que certains facteurs climatiques et qu'il peut avoir un effet sur la variation de certains caractères (Jacquemond *et al.*, 2013).



**Figure 21.** Fruits des six cultivars d'oranger étudiés dans le cadre de l'essai multi-site

### 1.3.3. Prélèvement et échantillonnage

Durant cette étude, plus de sept prélèvements répartis sur la période de développement et de maturation ont été faits sur les trois sites (Tableau2).

En Corse un prélèvement a été effectué le 11/07/2012, 73 jours après l’anthèse ce qui correspond à la fin de la première phase de croissance du fruit. Deux autres prélèvements ont été faits au cours de la phase II: un au milieu et un à la fin ce qui correspond en date calendaire au 30/07/2012 et au 20/08/2012. Du quatrième au septième prélèvement, nous nous situons dans la troisième phase de développement du fruit, la maturation (20/09/2012, 20/11/2012, 21/01/2013, 21/03/2013).

En Tunisie et en Espagne, les prélèvements ont été faits à la fin de la deuxième phase de développement du fruit (le grossissement cellulaire) et tout au long de la phase de maturation aux mêmes périodes qu’en Corse avec parfois un décalage de quelques jours. Le tableau 2 résume les dates de prélèvement selon les variétés et les sites.

Dans cette expérimentation nous avons utilisé la date de l’anthèse comme date repère pour tous les sites pour pouvoir comparer les fruits à un âge physiologique similaire sur les trois sites. Il est à noter que les dates de l’anthèse en Corse, en Espagne et en Tunisie correspondent au jour où le nombre de fleurs ouvertes atteint son apogée (son maximum) et sont respectivement, les 29/04/2012, 15/04/2012 et 10/04/2012.

**Tableau 2.** Dates de prélèvement selon les sites et les variétés

<b>Corse</b>	<b>D</b>	11/07/12	23/07/12	20/08/12	18/09/12	27/11/12	16/01/13	27/03/13			
	<b>NJA</b>	73	85	113	142	212	262	332			
<b>Tunisie</b>	<b>D</b>	18/09/12	23/10/12	27/11/12	15/12/12	09/01/13	25/01/13	13/02/13	23/03/13		
	<b>NJA</b>	161	196	231	249	274	290	309	347		
<b>Espagne</b>	<b>Navelina</b>										
	<b>D</b>	18/10/12	23/10/12	06/11/12	21/11/12	05/12/12	18/12/12	04/01/13	17/01/13	29/01/13	
	<b>NJA</b>	186	191	205	220	234	247	264	277	289	
	<b>Washington navel</b>										
	<b>D</b>	02/11/12	13/11/12	26/11/12	11/12/12	28/12/12	09/01/13	21/01/13	06/02/13	21/02/13	
	<b>NJA</b>	201	212	225	240	257	269	281	297	312	
	<b>Navelate</b>										
	<b>D</b>	06/11/12	21/11/12	05/12/12	18/12/12	04/01/13	17/01/13	29/01/13	13/02/13	27/02/13	12/03/13
	<b>NJA</b>	205	220	234	247	264	277	289	304	318	331

D : Date de prélèvement, NJA : Nombre de jours après anthèse

Pour réaliser les mesures des différents paramètres, nous avons récolté 12 fruits par variété, à raison de 4 fruits par arbre, un fruit sur les quatre faces de l’arbre.

## **2. Méthodes**

### **2.1. Enregistrement des données climatiques**

Au cours de l'étude multi-site réalisée en 2012/2013, des relevés de données climatiques à savoir les températures journalières moyennes minimales, maximales, l'humidité relative, la vitesse du vent, la radiation solaire ... ont été enregistrées quotidiennement sur toute la période d'étude.

### **2.2. Phénotypage et suivi des paramètres de la qualité du fruit et d'abscission**

#### **2.2.1. Suivi des paramètres physico-chimiques du fruit**

La maturation se traduit par une série de changements biochimiques, physiologiques et physiques. L'étude de la croissance et de la maturation du fruit nécessite ainsi le suivi de l'évolution de certains paramètres qui traduisent ces changements pendant cette phase. Au cours de notre étude, nous avons étudié les principaux paramètres physico-chimiques du fruit dont certains interviennent lors du passage des fruits de l'état immature à l'état mature.

##### **2.2.1.1. Paramètres physiques du fruit**

Plusieurs paramètres pomologiques ont été mesurés tout au long de la maturation sur les fruits sur les trois dispositifs expérimentaux. Des mesures de la masse, du diamètre équatorial et polaire, de la largeur du pédoncule, de l'épaisseur de l'écorce et de la couleur ont été effectuées.

Pour déterminer **l'épaisseur de l'écorce**, nous avons procédé de la manière suivante : sur chaque fruit coupé en deux au niveau de l'équateur du fruit la largeur maximale du fruit entier ainsi que la largeur maximale de l'endocarpe ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. La différence entre les deux valeurs divisée par deux représente l'épaisseur de la peau (en mm).

**La forme du fruit** a été déterminée via la formule suivante: diamètre équatorial/diamètre polaire.

**La fermeté** des fruits est une caractéristique des fruits qui diminue au cours de la maturation. Elle évolue au cours de la croissance et de la maturation du fruit. Son évolution est due à la dégradation de la paroi cellulaire au cours du développement du fruit suite à de nombreuses réactions enzymatiques. Pour mesurer ce paramètre, nous avons utilisé un pénétromètre « Agrostat 14Xa ». La mesure consiste à évaluer en kilogrammes/cm<sup>2</sup>, la

résistance à la pénétration d'un embout de 11 mm de diamètre à l'intérieur du fruit au niveau équatorial.

**Les mesures de l'indice colorimétrique** ont été effectuées à l'aide d'un chromamètre (Minolta CR400). Un tel appareil, permet de mesurer les couleurs de façon quantitative selon trois indices,  $L^*$ ,  $a^*$  et  $b^*$ , repérables dans un espace cartésien. Le modèle CIE  $L^*a^*b^*$  est le modèle le plus utilisé. Il possède le grand avantage de donner une mesure objective car les distances entre deux points de couleur sont proportionnelles aux différences perçues par l'œil humain. Dans ce système, le  $L^*$  représente la clarté (indice de luminosité relatif allant de 0 pour le noir à 100 pour le blanc absolu), le  $a^*$  représente la composante chromatique vert-rouge-et le  $b^*$  représente la composante chromatique bleu-jaune- (CIE, 1986) avec des valeurs allant du négatif au positif. L'index de couleur CCI pour « citrus color index », est calculé comme suit :  $CCI = 1000 \times a / (L \times b)$  (Jiménez-Cuesta *et al.*, 1982). Une valeur négative de CCI très inférieure à 0 indique une couleur vert foncée, une valeur proche de zéro représente une couleur vert-jaune (fruit tournant), une valeur faible positive est l'indication d'une couleur jaune-orange et une couleur positive et élevée indique une couleur orange ou rouge. Il est à signaler que la formule CCI se calcule avec les indices de couleur du système Lab Hunter mais dans notre cas, le calcul a été fait à partir des indices de couleur CIE  $L^*a^*b^*$  mais les deux espaces de couleurs sont très proches. La valeur du CCI est un indicateur approximatif de la couleur et le changement d'espace de couleur ne modifie en rien les indications qu'il renseigne. Les mesures ont été effectuées à raison de 4 mesures par fruit sur 10 fruits par hybride. Une moyenne a été caractérisée pour chaque génotype.

#### ***2.2.1.2. Paramètres biochimiques du fruit***

**Le pourcentage de jus** a été déterminé chez tous les fruits prélevés. Le jus a été extrait à l'aide d'un presse-agrumes mécanique (Santos), filtré à travers une passoire au maillage de 1 mm et pesé.

**L'acidité** a été déterminée à l'aide d'un titrateur automatique (Metler Toledo DL50). Le principe de la mesure de l'acidité est la neutralisation de tous les acides contenus dans le jus par une solution de soude normée à 0.1 N (généralement, neutralisation atteinte lorsque le pH atteint 8.3). C'est donc par le volume de soude ajouté pour la neutralisation que l'acidité peut être évaluée selon la formule  $\text{volume de la soude} \times \text{concentration de la soude} \times 100 \times 192 / 1000 \times 3 \times \text{poids de l'échantillon}$  exprimé en g d'acide citrique/100g.



**La teneur en sucres solubles (TSS)** a été mesurée au moyen d'un réfractomètre. La réfractométrie est une méthode d'analyse permettant de mesurer la quantité de sucres solubles présente dans un fruit grâce à la mesure de l'angle de déviation de la lumière. L'indice réfractométrique est la propriété physique utilisée pour caractériser les liquides. Sa mesure s'effectue par la détermination de l'angle de réflexion d'un rayon lumineux sachant que cet angle est spécifique pour chaque milieu traversé. Il caractérise le pourcentage de matière sèche soluble et il permet ainsi une évaluation relativement fiable de la composition en sucres. La TSS est exprimée en °Brix.

Au cours des premiers prélèvements effectués en Corse, les fruits étaient encore immatures et ne contenaient pas assez de jus pour déterminer directement la TSS et l'acidité. En effet pour déterminer les teneurs en sucres solubles et en acidité, la pulpe des fruits a été pesée, puis lyophilisée, broyée puis pesée et enfin diluée avec 5 mL d'eau. Le coefficient de dilution a été pris en compte lors des calculs finaux.

A partir des valeurs d'acidité et de TSS nous avons pu calculer l'indice de maturité des fruits (E/A). Le rapport des sucres sur acidité détermine le caractère doux, équilibré ou acidulé du fruit. Il est aussi le critère d'évaluation par excellence de la maturité des variétés de bouche comme les mandarines, oranges, clémentines, etc.... Bien que très dépendant de l'acidité car c'est le paramètre le plus fluctuant, il est très utilisé dans les systèmes de production.

### ***2.2.2. Suivi de l'évolution de la Force de Détachement du Fruit au cours de la maturation***

Le déroulement de l'abscission intègre une phase initiale où la force d'attachement du fruit à son pédoncule diminue. Nous avons donc étudié ce caractère appelé également FDF à l'aide d'un dynamomètre. Ce paramètre nous renseigne sur la force nécessaire pour détacher un fruit de son pédoncule et est exprimé en Newton (N). La zone de séparation est située au niveau du calice du fruit. Une FDF inférieure à 5 N représente une attache très faible du fruit à son pédoncule et donc sur le point de chuter.

### ***2.2.3. Analyses biochimiques***

Pour l'analyse de l'acidité et de la teneur en sucres nous avons mesuré la quantité de leurs principaux composants à savoir pour les sucres, le saccharose, le fructose et le glucose et pour l'acidité, le citrate et le malate. Le dosage a été fait par la méthode enzymatique qui est

plus précise et plus économique que l'HPLC. La préparation des échantillons, l'extraction des sucres et des acides organiques et leur dosage ont été adaptés aux agrumes à partir des protocoles élaborés par Gomez *et al.* (2007). Quelques modifications ont été apportées à ces protocoles.

### ***2.2.3.1. Préparation des échantillons***

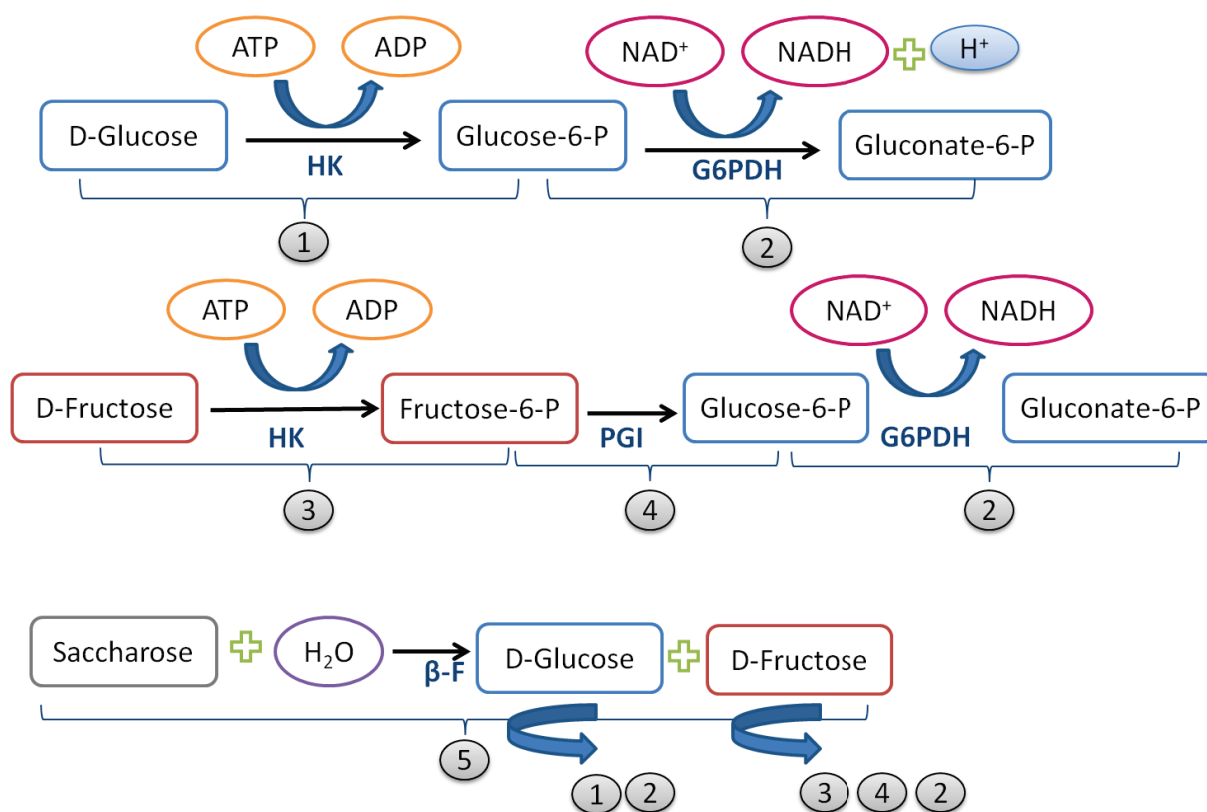
Les fruits prélevés sur la population ont été pesés, pelés, repesés, coupés et lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur (Christ BETA 1-8-LD). La durée de la lyophilisation a été plus au moins variable selon les échantillons. Celle-ci peut durer à jusqu'à deux semaines pour que les échantillons soient complètement secs. Les échantillons sont pesés avant et après lyophilisation afin de déterminer le pourcentage de matière sèche de chaque échantillon. Les échantillons secs sont ensuite réduits en poudre très fine à l'aide d'un broyeur à bille « Tissue lyser II » et conservés à -20°C.

### ***2.2.3.2. Extraction des sucres et des acides***

Pour extraire les sucres et les acides à partir de la poudre lyophilisée, on s'est inspiré du protocole de Gomez *et al.* (2007) qui a été simplifié. L'extraction a été faite à partir de 20 mg de poudre lyophilisée et solubilisée dans 2 mL d'eau ultra pure. La suspension est agitée avec deux billes à une fréquence de 15 Hz pendant 5 min à l'aide d'un broyeur à billes et centrifugée pendant 5 mn à 13 200 tr/min à 4°C. Pour éliminer des composés phénoliques susceptibles d'interférer lors du dosage, 10 mg de PVPP sont rajoutés à 1 600 µL du surnageant. Le mélange est agité pendant 20 min (40 tr/min) à 4°C pour être ensuite centrifugé pendant 10 min à 13 200 tr/min, à 4°C. Le surnageant est récupéré et conservé à -20°C afin d'être dosé. Il est à signaler que les deux protocoles permettent d'extraire à la fois les sucres et les acides organiques.

### ***2.2.3.3. Dosage par méthode enzymatique des sucres***

La formation de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) au cours de l'oxydation du glucose-6-phosphate représente un bon indicateur pour déterminer la quantité de glucose, de fructose et de saccharose initialement présente dans une solution. Pour cela, le principe du dosage enzymatique consiste à mettre en œuvre plusieurs réactions chimiques en cascade qui permettent la transformation de trois sucres en Glucose-6-phosphate ainsi que son oxydation en NADH (figure 22).



**Figure 22.** Réactions chimiques mises en œuvre au cours de dosage enzymatique des sucres. ATP : Adénosine-5'-triphosphate, ADP : Adénosine diphosphate, NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide, HK : Héxokinase, G6PDH : Glucose-6-phosphate, PGI : Phosphoglucose isomérase,  $\beta$ -F :  $\beta$ -Fructosidase.

Plusieurs préparatifs précèdent le dosage. En effet, il est nécessaire de préparer les solutions tampon, diluer les échantillons, préparer les points de gamme d'étalon et préparer les solutions enzymatiques avant de commencer le dosage. Afin de préparer les solutions enzymatiques, il est recommandé de préparer le tampon triéthanolamine de pH 7.6 et la solution de sulfate d'ammonium à 2.5 M à l'avance. La solution tampon est faite en mélangeant 55.9 g de triéthanolamine, 2.5 g de sulfate de magnésium et quelques gouttes d'HCl dans 500 mL d'eau ultra pure. Pour obtenir la solution de sulfate d'ammonium 16.7 g de ce réactif sont solubilisés dans 50 mL d'eau ultra pure. Une fois que le tampon triéthanolamine est prêt la première solution enzymatique (S1) peut être préparée. Pour cela, 30 mg de NAD, 150 mg d'ATP (Adénosine-5'-triphosphate) et 150 mg de  $\text{NaHCO}_3$  (Carbonate de sodium) sont solubilisés dans 3 mL d'eau et 12 mL du tampon triéthanolamine. La deuxième solution (S2) est obtenue en mélangeant 33  $\mu\text{L}$  de G6PDH (Glucose-6

phosphate déshydrogénase), 33  $\mu\text{L}$  d'hexokinase, 940  $\mu\text{L}$  de la solution de sulfate d'ammonium et 2 mL d'eau ultra pure. La troisième solution (S3) contient 20  $\mu\text{L}$  de phosphoglucose isomérase (PGI) rajoutés à 14 mL d'eau ultrapure. Quant à la quatrième solution (S4), elle est obtenue par la dissolution de 8 mg de  $\beta$ -fructosidase dans 3 mL d'eau ultra pure. La préparation des solutions enzymatiques est suivie par la dilution des échantillons et par la préparation des points de la gamme faite à partir d'une solution mère du glucose, fructose et saccharose de concentration 2 g/L. Ces deux étapes peuvent être faites avant ou après la préparation des solutions enzymatiques.

Pour démarrer le dosage, 150 mL des échantillons et des points de la gamme sont déposés dans les puits de la microplaque. 10  $\mu\text{L}$  de la S1 sont rajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite agitée et une mesure de densité optique à 340 nm est effectuée. Pour initier les deux premières réactions chimiques permettant la quantification du glucose, 20  $\mu\text{L}$  de la S2 sont distribués. La microplaque est de nouveau agitée. Après une incubation de 3 heures à température constante de 25°C, une lecture de densité optique est réalisée. Pour quantifier le fructose, 20  $\mu\text{L}$  de S3 sont déposés et mélangés dans la même microplaque. Au bout de 3 heures d'incubation à 25°C, une nouvelle lecture de la densité optique est faite. Le dosage continue encore en rajoutant 20  $\mu\text{L}$  de S4. Les réactions initiées par cette solution enzymatique permettent la détermination de la quantité du saccharose présente dans les échantillons. La microplaque est agitée et incubée dans une étuve pendant 3 heures à 25°C. Le dosage se termine par une dernière lecture de la densité optique à la même longueur d'onde : 340nm. Les valeurs de la densité optique sont ensuite utilisées pour la quantification des trois sucres en se référant à la gamme étalon.

Les réactions de dosage du glucose et du fructose durent chacune deux heures selon le protocole de Gomez *et al.* (2007). Cette durée n'a pas été suffisante pour atteindre le plateau au cours de notre dosage. Selon les tests effectués, 3 heures été nécessaires pour stabiliser la réaction.

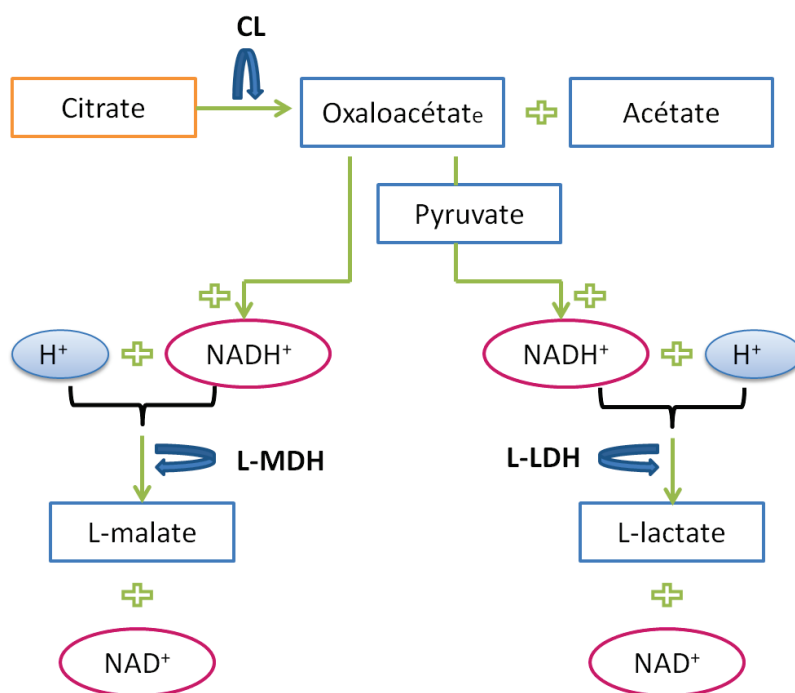
#### ***2.2.3.4. Dosage par méthode enzymatique des acides organiques***

Le dosage des deux acides organiques a été effectué selon le protocole élaboré par l'équipe de Laurent Gomez à Avignon (unité PSH, INRA Avignon, France). Le protocole n'est pas encore publié. Avant d'utiliser ce protocole, quelques tests ont été effectués pour valider la méthode sur agrumes. Les seules modifications apportées à ce protocole consistent

à diminuer la durée des deux réactions de dosage de l'acide citrique et de l'acide malique à 2 heures au lieu de 3 heures pour l'acide citrique et à 2 h:45 pour l'acide malique.

### 2.2.3.5. Dosage de l'acide citrique

La quantification de l'acide citrique contenu dans les extraits se fait via la quantification de la disparition du NADH utilisé au cours des réactions de la dégradation de l'acide citrique (Figure 23). La première réaction régénère de l'oxaloacétate qui se transforme soit en L-malate sous l'action de L-MDH (L-Malate déshydrogénase) soit en pyruvate qui lui-même se transforme en L-Lactate sous l'action de L-LDH (L-Lactate déshydrogénase). Ces deux dernières réactions consomment de la NADH dont la quantité utilisée est proportionnelle à la quantité d'acide citrique dégradée.



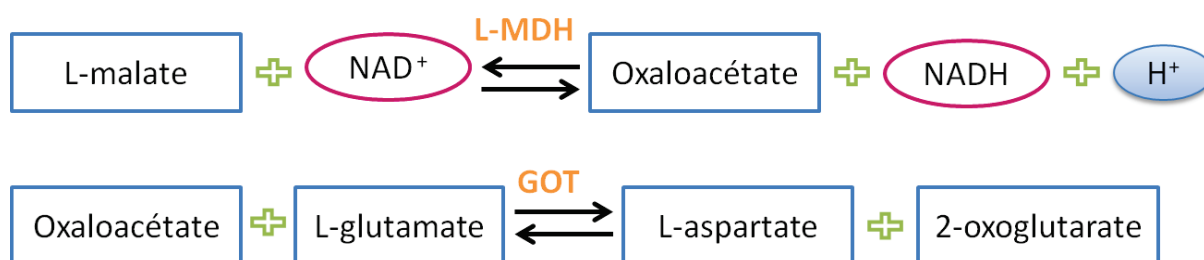
**Figure 23.** Réactions chimiques mises en œuvre lors de dosage enzymatique de l'acide citrique. L-MDH : L-Malate Déshydrogénase, L-LDH : L-Malate Déshydrogénase, CL : Citrate lyase

Pour doser l'acide citrique, deux solutions enzymatiques sont préparées. La première solution (S1) contient 12 mL de tampon glycyl glycine à pH7.8 (4.75 g de glycyl glycine, 880 mg d'acide L-glutamique, environ 1.5 mL de NaOH (10 N) et 60 mL d'eau ultra pure), 23 µL de malate déshydrogénase (MDH), 102 µL de lactate déshydrogénase LDH et 5 mg de Nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). Par ailleurs la deuxième solution (S2) est

obtenue suite à la solubilisation de 48 mg de citrate lyase dans 3 mL d'eau ultra pure. En plus des solutions enzymatiques, huit points de gamme à concentrations différentes allant de 0 à 50 mg/L sont préparés à partir d'une solution mère d'acide citrique de concentration 1 g/L. Les échantillons correspondant aux différents points de la gamme sont déposés dans la microplaque avec les échantillons qui sont dilués auparavant. 100  $\mu$ L de la solution S1 sont distribués. La microplaque est ensuite agitée pendant 30 secondes. Cette agitation est suivie de 10 minutes d'attente avant de faire la première lecture de la densité optique à 340 nm (maximum d'absorption de NADH). Un ajout de 20  $\mu$ L de S2 est ensuite effectué. Après deux heures d'incubation dans une étuve à 25°C, une deuxième lecture de densité optique est effectuée. Les concentrations d'acide citrique sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage.

### 2.2.3.6. Dosage de l'acide malique

Le dosage d'acide malique par la méthode enzymatique se base sur la détermination de la quantité de NADH formée au cours de la dégradation de l'acide malique. Au cours de ces réactions de dégradation de l'acide malique, le L-malate déshydrogénase en présence de  $\text{NAD}^+$  oxyde l'acide malique en NADH et en oxaloacétate. Ce dernier se transforme en L-aspartate et en 2-oxoglutarate sous l'action de glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) (Figure 24).



**Figure 24.** Réactions chimiques mises en œuvre lors du dosage de l'acide malique. L-MDH : L-Malate Déshydrogénase, GOT : Glutamate-oxaloacétate transaminase

Pour mettre en œuvre ces réactions de dosage de l'acide malique, il est nécessaire de diluer les échantillons et de préparer les points de la gamme étalon ainsi que les solutions enzymatiques.

Les points de la gamme sont préparés à partir d'une solution mère d'acide malique dont la concentration est égale à 1 g/L. La concentration des points de la gamme va de 0 à 50 mg/L. La préparation des solutions enzymatique commence par la préparation du tampon glycyglycine à pH 10. Pour cela 4.75 mg de glycyglycine, 880 mg d'acide L-glutamique et environ 4 mL de NaOH (10 N) sont solubilisés dans un volume de 60 mL d'eau ultra pure. La première solution enzymatique (S1) est obtenue en mélangeant 6 mL de ce tampon et 6 mL d'eau ultra pure. La deuxième solution (S2) contient 54 mg de NAD<sup>+</sup> dissous dans 3 mL d'eau ultra pure. Les deux enzymes catalyseurs des deux réactions sont présentes dans les troisième et quatrième solutions. En effet, la troisième solution (S3) est préparée en mélangeant 20 µL de GOT dans 2.98 µL d'eau ultra pure. Quant à la quatrième solution (S4), elle est obtenue suite à la dilution de 20 µL de L-MDH dans 2.98 µL d'eau ultra pure.

Une fois le tampon, les solutions enzymatiques et la gamme préparés, 100µL des échantillons et des points de gamme sont déposés dans les puits de la microplaque. A ce volume initial, 100 µL de S1, 20 µL de S2 et 20 µL de S3 sont rajoutés. La microplaque est ensuite agitée. Une lecture de la densité optique est effectuée à 340 nm (longueur d'onde d'absorbance maximum du NADH), 10 minutes après l'agitation. La première mesure de la densité optique est suivie par l'ajout de 20 µL de S4. Les réactions de la dégradation d'acide malique sont alors initiées. La microplaque est agitée puis incubée dans une étuve pendant deux heures à température constante égale à 25°C. Après incubation, une nouvelle lecture de la densité optique est réalisée. Les données sont ensuite analysées pour déterminer la quantité d'acide malique présente initialement dans les échantillons.

### ***2.3. Analyses statistiques***

Plusieurs répétitions ont été faites au cours des mesures effectuées afin d'avoir une valeur moyenne et un écart type représentatifs de chaque caractère mesuré à une date donnée pour réaliser les tests statistiques. Les données sont ainsi présentées sous forme d'une moyenne de 8 à 12 répétitions ± l'erreur standard ou l'écart type de cette moyenne. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'analyse de la variance des moyennes avec les tests ANOVA pour évaluer la signification de l'effet génotype, année, environnement et interaction environnement \* génotype au seuil  $P < 0,05$  avec le test Newman Keuls.

En plus des tests ANOVA, des analyses des corrélations ont été également effectuées. Les coefficients de corrélation de Spearman sont utilisés pour étudier le lien éventuel qui

existerait entre les différents paramètres physico chimiques de la maturation et de l'abscission.

Pour le premier dispositif expérimental dont l'objectif est de cartographier les QTL des principaux paramètres de maturation et d'abscission, d'autres analyses statistiques ont été effectuées en plus des analyses citées ci-dessus. En effet, les valeurs mesurées sur la population d'hybride ont été utilisées pour déterminer la distribution des caractères et leur normalité à l'aide des tests Shapiro-Wilk, et Kolmogorov-Smirnov et Lilliefors.

Les caractères dont la distribution ne suit pas la loi normale ont subi des transformations par les fonctions mathématiques (logarithme (Ln), racine carrée...) pour les rapprocher le plus possible de la loi normale. Ces valeurs ont été ensuite transformées par la méthode statistique de meilleur prédicteur linéaire non biaisé nommée communément BLUP, et ce par référence à la terminologie anglosaxonne « Best Linear Unbiased Prediction) (Henderson, 1974; Henderson, 1963; Henderson *et al.*, 1959). Cette méthode permet l'estimation des effets environnementaux et génétiques simultanément (Chalh, 2012). A l'aide d'un script R développé par Doligez *et al.*, (2013) des valeurs génétiques ont été estimées à partir des données phénotypiques. Le modèle mixte utilisé est le suivant :  $P_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$  avec

$P_{ij}$  : valeur phénotypique du fruit j du génotype i

$\mu$  : la moyenne globale

$G_i$  : l'effet aléatoire du génotype i

$e_{ij}$  : l'effet de l'erreur résiduelle

Le script R a permis aussi de normaliser les caractères et de calculer l'héritabilité  $H^2$  à l'aide de la formule suivante :  $H^2 = \sigma^2_G / (\sigma^2_G + (\sigma^2_e/n))$  avec

$\sigma^2_G$  : la variance génotypique,

$\sigma^2_e$  : la variance résiduelle,

n: nombre moyen de fruits par descendant.

Une analyse de corrélation a été effectuée sur les nouvelles valeurs de BLUP en utilisant le test de Spearman. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des deux logiciels STATISTICA version 10 et R.



## **2.4. Génotypage et analyses moléculaires**

La cartographie des QTL sur la population d'hybride clémentinier x mandarinier nécessite des données de phénotypage des caractères étudiés, mais aussi des données de génotypage qui servent d'abord à la construction de la carte génétique. L'obtention des données génotypiques se fait en plusieurs étapes en commençant par l'extraction d'ADN.

### **2.4.1. Extraction de l'ADN**

L'extraction d'ADN a été faite à partir des feuilles prélevées sur des jeunes pousses selon la méthode « MATAB » adaptée pour le marquage SSR (Luro *et al.*, 2008) découlant du protocole de Doyle et Doyle (1987). De chaque échantillon 100 mg du limbe de feuille sont réduits en poudre dans un mortier avec de l'azote liquide. Ensuite 750 µL de tampon d'extraction (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, Tris 0.1 M pH8, EDTA 20 mM, PVP 1%, Bisulfite de sodium 0.5%) et 1 µL d'une solution d'ARNase A sont ajoutés. Après une incubation de 20 mn à 65°C dans un bain-marie, 750 µL de mélange chlorophorme alcool iso amylique (24 vol/1vol) sont rajoutés. Le mélange est ensuite agité et centrifugé (5 min à 10 000 g). Le surnageant est repris et mélangé à 500 µL d'isopropanol, mélangé, puis centrifugé (5 min à 5 000 g). Le culot est lavé par ajout de 200 µL d'éthanol à 70%. Après la centrifugation (5 min à 5 000 g), le culot est directement séché et repris ensuite dans 50 µL d'eau ultra pure.

### **2.4.2. Vérification de la qualité d'ADN par migration sur gel d'agarose**

La vérification de l'absence de dégradation de l'ADN est réalisée par la migration en électrophorèse en gel d'agarose. Les fragments d'ADN extraits sont ainsi séparés en fonction de leur taille. La migration de l'ADN sur le gel d'agarose dure de 30 à 60 min à 110 V. Le gel est réalisé en dissolvant 0.8% d'agarose dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-Base, 25 mM EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique), 20 mM d'acide acétique). Le TAE (Tris-Acétate-EDTA) fournit une solution ionique qui permet le passage du courant à travers l'eau. Le Tris permet de maintenir l'ADN déprotoné en solution. L'EDTA protège les acides nucléiques de la dégradation en supprimant certains ions métalliques et désactivant les enzymes qui dégradent l'acide nucléique. La révélation de l'ADN dans le gel est assurée par l'incorporation de bromure d'éthidium (BET) après migration électrophorétique dans une solution à 1 µg /L. La détection de la fluorescence a été effectuée sous éclairage ultra-violet 330 nm (Sambrook *et al.*, 1989).

### **2.4.3. Dosage de l'ADN**

Après avoir vérifié son intégrité l'ADN est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). 1µL d'échantillon est déposé directement à l'extrémité d'un câble de fibre optique. Lors de la mise en contact des deux câbles, l'échantillon est traversé par un signal lumineux permettant ainsi la mesure du spectre d'absorption et la détermination de la quantité d'ADN.

### **2.4.4. Choix des marqueurs moléculaires**

Pour construire la carte génétique 645 marqueurs génétiques dont 551 marqueurs SNP et 94 marqueurs SSR ont été utilisés. Les marqueurs SSR ont été produits dans notre laboratoire AGAP de l'INRA de Corse à partir de banques génomiques de mandarinier (Froelicher *et al.*, 2008) et d'EST-SSR de clémentinier (Luro *et al.*, 2008). Les marqueurs SNP ont été sélectionnés parmi les 1 536 marqueurs utilisés pour l'élaboration de la carte génétique de référence des agrumes établie sur le génome du clémentinier (Ollitrault *et al.*, 2012). La majeure partie des marqueurs SNP proviennent du séquençage des extrémités de clones BAC du génome du clémentinier (Terol *et al.*, 2008). Au total plus de 6 600 SNP ont été repérés dans les 6 461 contigs couvrant 6.14 Mb de séquences. A cela viennent s'ajouter 121 SNP marqueurs qui ont été définis à partir de séquences de fragments amplifiés de gènes candidats des métabolismes primaires et secondaires impliqués dans les voies de synthèses de certains caractères de la qualité des fruits. Ces séquences ont été obtenues à partir des génomes de représentants des 4 espèces de base (Ollitrault *et al.*, 2012). Il est à signaler que les marqueurs SNP (Simple mutation ponctuelle ; Single Nucleotide Polymorphism) sont des marqueurs bi-alléliques dont la variation porte sur une seule base (Vignal *et al.*, 2002). En revanche, les marqueurs microsatellites dits aussi SSR (Simple Sequence Repeats) sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri ou tetra-nucléotidique (de Vienne, 1998). Ce polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétitions. Les deux types de marqueurs sont des marqueurs co-dominants et révèlent donc l'hétérozygotie de leurs locus (Beuzen *et al.*, 2000).

### **2.4.5. Réactions PCR**

Le marquage moléculaire des hybrides de la descendance a été réalisé au laboratoire pour les marqueurs SSR par amplification de réactions PCR (Polymerase Chain Reaction). Le choix des amorces a été fait en fonction de leur spécificité à la séquence d'ADN cible et d'une température d'hybridation de 50°C pour les SSR génomiques et de 55°C pour les EST-

SSR. La solution PCR contient le tampon PCR (Eurogentec), le  $MgCl_2$  (1.5 mM), les 4 dNTP (0.2 mM), les 2 amorces (0.4  $\mu M$  chaque), la Taq polymérase (1 Unité), et l'ADN (10 ng). Les réactions d'amplification ont été conduites sur un thermocycleur MWG AG Biotech programmé pour une pré dénaturation initiale de 5 min à 94°C, suivie de 40 cycles d'amplification comportant chacun une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une étape d'hybridation d'une minute à la température définie pour les amorces et une étape d'élongation de 45 secondes à 72°C, et enfin une élongation finale à 72°C pendant 4 min.

#### ***2.4.6. Electrophorèse en gel de polyacrylamide***

Les fragments d'amplification sont ensuite séparés selon leur longueur par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Cette méthode repose sur la faculté des molécules chargées à migrer quand elles sont soumises à un champ électrique. Les fragments sont ainsi séparés selon leurs tailles. Pour cela, on utilise deux plaques en verre de dimension 42 cm  $\times$  31.5 cm  $\times$  4 mm. Pour la rendre hydrophobe, la première plaque est traitée avec un produit répulsif (RainX) alors que la deuxième est traitée avec du silane (1.5  $\mu L$  de silane dilué dans 1 mL d'alcool à 96°C) afin de coller le gel sur cette dernière. Le gel se compose de 50 mL d'une solution à 5% de polyacrylamide (acrylamide : bis-acrylamide ; 19:1), TBE 0.5 X, de 7 M d'urée, de 400  $\mu L$  d'ammonium persulfate 10% (initiateur de la polymérisation) et de 40  $\mu L$  de TEMED (tétra-méthyl-éthylène-diamine ; catalyseur de la polymérisation). 4  $\mu L$  de chaque solution d'amplification diluée par 1 volume égal de tampon de charge (98 mL formamide, 25 mg xylène cyanol FF, 25 mg bleu de bromophénol, 2ml EDTA 0.5M à pH8) et dénaturée de 10 min à 95°C, sont déposés dans le gel polymérisé. Un marqueur de tailles (10 bp, Invitrogen) est également déposé pour déterminer la taille des fragments en nombre de bases. La migration dure entre 1 h30 et 2 h30 selon la taille attendue des amplifiats à 80 W.

La révélation des ADN amplifiés et séparés selon leurs longueurs est réalisée par précipité de sels de Nitrate d'argent selon le protocole suivant: une incubation du gel dans un bain d'alcool à 10% pendant 30 min pour fixer l'ADN ; un bain d'acide nitrique à 1% de 5 minutes ; un double rinçage à l'eau ultra pure durant 5 min chacun ; un bain de 30 mn dans une solution de nitrate d'argent à 0.2% ; et bain pour la révélation dans une solution de carbonate de sodium à 3% additionnée de 600  $\mu L/L$  de formaldéhyde, après apparition des ADN amplifiés la réaction de précipitation est stoppée par un bain d'acide acétique à 5 %.

Pour les marqueurs SNP, le génotypage de la population clémentinier x mandarinier Willow Leaf a été réalisé à l'UR EPGV de l'INRA d'Evry à l'aide d'une puce à ADN

GoldenGate (Illumina) avec 1 457 SNP d'extrémités de clones BAC et 37 SNP de gènes candidats. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Genome Studio (Illumina).

#### 2.4.7. Marqueurs moléculaires : Polymorphisme et codage

En cartographie génétique, les marqueurs moléculaires doivent être impérativement polymorphes. Ce polymorphisme se traduit par une variation allélique. Une première étape a consisté ainsi à tester le niveau de polymorphisme de l'ensemble des marqueurs génotypés. Par conséquent, les SNP et les microsatellites monomorphes entre les deux génotypes parentaux ont été écartés. Suite à cette sélection, 622 marqueurs polymorphes ont été retenus.

Les marqueurs ont été codés en fonction de leur ségrégation selon la nomenclature proposée par JoinMap. Pour chaque marqueur, chaque individu présente 2 ou plusieurs allèles, et chaque allèle différent est codé par une lettre différente. Les lettres du code correspondent chacune à un type de ségrégation. Les différents profils qu'on a pu rencontrer au sein de notre population ainsi que le type de ségrégation mendélienne associée figurent dans le tableau 3.

**Tableau3.** Codage des génotypes d'une population de type CP

Code	Description	Génotype possible de la descendance	Ségrégation mendélienne
<efxeg>	Locus hétérozygote chez les deux parents, 3 allèles	ee, eg, fe, fg	1 :1 :1 :1
<hkxhk>	Locus hétérozygote chez les deux parents, 2 allèles	hh, hk, kk	1 :2 :1
<lmxll>	Locus hétérozygote chez le premier parent	ll, ml	1 :1
<nnxnp>	Locus hétérozygote chez le deuxième parent	nn, np	1 :1

Les marqueurs hétérozygotes chez un parent (AB) et homozygote chez le deuxième parent sont codés comme suit: <nnxnp> ou <lmxll>. En ce qui concerne les marqueurs multi alléliques, 6 configurations ont été rencontrées lors du codage. Selon la nomenclature de JoinMap, les marqueurs qui ont présenté les deux configurations AAxAB et CCxAB ou l'inverse ont été codés respectivement <nnxnp> et <lmxll>. Dans notre cas, <lmxll> et <nnxnp> codent respectivement les marqueurs spécifiques du clémentinier et du mandarinier.

Les marqueurs présentant trois allèles différents <ABxAC> et deux allèles différents <ABxAB> ont été codés <efxeg> et <hkxhk>. La ségrégation de plusieurs marqueurs homozygotes ainsi qu'hétérozygotes au sein de la population d'hybrides a montré la présence des allèles nuls (0). Le codage de ces marqueurs est résumé dans le tableau 3.

## **2.5. Analyses bio-informatiques**

### **2.5.1. Construction des cartes génétiques**

La liaison génétique entre marqueurs moléculaires a été testée à l'aide du logiciel JoinMap4.1 (Van Ooijen, 2006). Les données de génotypage ont été déclarées comme étant issues d'une population « CP » qui résulte d'un croisement entre deux parents diploïdes hétérozygotes et homozygotes. Ce type de population est utilisé en cas d'absence des données préalables sur la phase de liaison « Linkage phase ». Les marqueurs ayant plus de 50% de données manquantes ainsi que les marqueurs séparés par une distance inférieure à 1cM ont été supprimés. Les distorsions de ségrégation ont été vérifiées avec le test  $\chi^2$  au seuil  $\alpha=0.05$ .

La distorsion de ségrégation va à l'encontre des lois fondamentales de la génétique mendélienne. Elle est définie comme une déviation significative des proportions des individus d'une classe génotypique donnée au sein d'une population ségrégante (Castro *et al.*, 2011). Le test de ségrégation  $\chi^2$  permet ainsi de vérifier la conformité de ségrégation des marqueurs vis à vis des lois de Mendel. Ce test se base sur la formule suivante :

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(Obs - Att)^2}{Att}, \text{ k correspond au nombre d'allèles parentaux.}$$

Il s'agit de comparer les fréquences alléliques observées (Obs) aux fréquences alléliques attendues au sein de la population en ségrégation. Ce test est effectué au moyen du logiciel JoinMap 4 (Van Ooijen, 2006) avant la construction de la carte génétique. Un test significatif reflète une distorsion de ségrégation (Tableau 4).

**Tableau 4.** Interprétation de la significativité du test de ségrégation  $\chi^2$  calculée par JoinMap

Significativité du test $\chi^2$	P-value	Interprétation
*	0.1	Marqueur à faible distorsion de ségrégation
**	0.05	
***	0.01	Marqueur à forte distorsion de ségrégation
****	0.005	Marqueur à très forte distorsion de ségrégation
*****	0.001	
*****	0.0005	
*****	0.0001	

La construction d'une carte génétique peut se résumer en trois grandes étapes : le regroupement des marqueurs qui sont sur le même groupe de liaison, leur ordonnancement et le calcul de la distance génétique entre marqueurs. Le regroupement des marqueurs, « Grouping » en anglais, permet d'obtenir les groupes de liaison qui dans une carte saturée représentent les chromosomes. Pour cela nous avons testé la liaison entre marqueurs deux à deux en utilisant la méthode de LOD score (Logarithm of odds ou logarithme des probabilités). Le LOD score est défini comme le logarithme décimal du rapport de la probabilité d'observation d'une ségrégation sous l'hypothèse d'une liaison génétique entre deux locus à la probabilité d'observation sous l'hypothèse d'indépendance génétique. Il s'agit de déterminer de combien l'hypothèse de liaison est plus probable que celle de la non liaison. La valeur seuil initial du LOD score a été fixée à 4 pour tous les groupes. Pour calculer les distances génétiques, deux fonctions de cartographie sont proposées par le logiciel JoinMap, la fonction de Haldane (Haldane, 1919) et la fonction de Kosambi (Kosambi, 1943). Contrairement à la fonction de Haldane, la fonction de Kosambi ne prend pas en compte les recombinaisons (« crossing over ») multiples.

La distance génétique calculée selon Kosambi (1943), tient en compte à la fois de la fréquence de recombinaison entre les loci deux à deux et également des interférences génétiques. En effet, la probabilité d'occurrence d'un crossing-over est proportionnelle à la distance génétique qui sépare les loci. Aussi, l'occurrence d'un « crossing-over » réduit la probabilité d'un deuxième « crossing-over » au voisinage du premier, c'est ce qu'on appelle le phénomène d'interférence. La distance génétique estimée correspond au pourcentage de « crossing-over » pour 100 méioses. Cette distance est exprimée en centiMorgan. La fonction Kosambi est plus proche de la réalité car il y a des contraintes mécaniques lors de la méiose

qui empêchent les « crossing over » multiples proches. Pour cela, la fonction retenue dans notre étude est celle de Kosambi, cette fonction ayant également été choisie pour construire la carte génétique de référence du clémentinier (Ollitrault *et al.*, 2012). A l'issue de l'analyse, la représentation graphique des groupes de liaison constitue ce que l'on appelle une carte génétique de liaison. La représentation de la carte consensus ainsi que les deux cartes parentales a été réalisée à l'aide du logiciel MapChart (Voorrips, 2002).

### **2.5.2. Détection des QTL**

La cartographie QTL a été réalisée à l'aide du logiciel MapQTL 6 (Van Ooijen et Kyazma, 2009) à partir des cartes génétiques précédemment construites et des données phénotypiques quantitatives collectées. Les informations concernant la détermination des phases de liaison génétique et la position des marqueurs sur chaque groupe de liaison ont été obtenues grâce au logiciel JoinMap4 (Van Ooijen, 2006).

Dans une première étape, les QTL putatifs ont été détectés par la méthode d'Interval Mapping (IM) (Lander et Botstein, 1989) et ensuite par la méthode de MQM (Multiple QTL Model) (Jansen, 1993; Jansen, 1994). La méthode d'Interval Mapping consiste en un test de vraisemblance (LOD score) de la présence d'un QTL sur chaque groupe de liaison. L'hypothèse nulle  $H_0$  qui correspond à l'absence du QTL est alors testée en tous points du génome entre chaque paire de marqueurs. Le LOD score maximal nous renseigne sur la position la plus probable du QTL. Le seuil de significativité du LOD score est choisi suite à un test de permutation à 1000 itérations qui prend en compte le nombre d'individus génotypés et le nombre de marqueurs. Les données phénotypiques sont ainsi permutées 1000 fois au hasard. Le seuil de significativité est ainsi défini en comparant la distribution des valeurs statistiques calculées à partir des données réellement observées à la distribution des valeurs statistiques calculées à partir des données redistribuées au hasard (Churchill et Doerge, 1994). Ce test est effectué pour tous les groupes de liaison. Le LOD score seuil est choisi à un risque alpha d'erreur égal à 5%. L'IM a été suivi par un MQM systématiquement pour augmenter la puissance du test et détecter les QTL à proximité à faible effet et /ou dont l'effet est masqué par un QTL dominant. Map QTL permet de détecter des QTL et de donner leur positions, leur intervalles de confiance (exprimée en cM) mais aussi la part de variance phénotypique qu'ils expliquent appelé  $R^2$  et exprimée en %. Il s'agit en fait d'une analyse de variance correspondant à la somme des carrés des écarts du caractère dans la zone QTL sur la somme des carrés des écarts phénotypiques totaux. Les QTL détectés sont ensuite dessinés sur les cartes génétiques à l'aide du logiciel MapChart 2.3 (Voorrips, 2002).

## **Chapitre I**

---

### **Effet de l'environnement et de la maturité des fruits sur l'abscission**



### *Résumé français*

L'abscission est un phénomène qui se produit habituellement lors de la phase finale de maturation des fruits. Toutefois, sur certains sites de production d'agrumes, il peut se produire bien avant la période de récolte habituelle et causer ainsi des pertes de fruits. L'impact de l'environnement et / ou des paramètres conduisant à l'abscission des fruits au cours de la maturation n'est pas encore élucidé. De manière à pouvoir expliquer les causes de l'abscission des fruits, une étude multi-sites a été réalisée en Corse, en Espagne et en Tunisie sur six variétés d'orange connues pour avoir différentes périodes de maturité. Une chute des fruits soudaine et massive a été observée en Tunisie et en Espagne de février à mars, mais pas en Corse. Les paramètres climatiques ont été enregistrés sur les trois sites et les critères de qualité des fruits et la Force de Détachement du Fruit (FDF) ont été mesurés au cours de la dernière étape de la maturation. Nous avons observé que la FDF diminuait en Tunisie et en Espagne, alors qu'en Corse, elle restait constante tout au long de la maturation des fruits, quelles que soient les variétés d'oranges. Comme nous l'attendions les valeurs des paramètres de la qualité des fruits ont été différentes sur les trois sites, mais leurs évolutions ont été similaires tout au long de la période de maturation. La FDF ne s'est pas révélée être un paramètre lié à des changements de paramètres de la qualité des fruits, mais dépendrait plus vraisemblablement de l'évolution des facteurs climatiques tels que les variations de température. En effet, les jours où les températures sont supérieures à 13 °C, il peut y avoir reprise de la croissance végétative. L'abscission de fruits massive en Tunisie et en Espagne par rapport à la Corse pourrait être donc reliée à la reprise plus précoce et plus rapide de la croissance végétative.

*1. Manuscrit sur l'effet de l'environnement et de la maturité sur l'abscission*

**Abscission of oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) in the Mediterranean Basin depends on environmental conditions independently of fruit traits**

Khefifi, H<sup>1,2</sup>, Selmane, R<sup>2</sup>, Ben Mimoun, M<sup>2</sup>, Tadeo, F, R<sup>3</sup>, Morillon, R<sup>1</sup> and Luro, F<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CIRAD, UMR AGAP, Avenue Agropolis - TA A-75/02 – 34398 Montpellier cedex 5, France

<sup>2</sup>INAT, 43, Avenue Charles Nicolle 1082 –Tunis – Mahrajène, Tunisia

<sup>3</sup>IVIA, Carretera CV-315, Km. 10,7 – 46113 Moncada (Valencia), Spain

<sup>4</sup>INRA, UMR AGAP Corse, 20230 San Giuliano, France

Manuscrit soumis à *Scientia Horticulturae*

**Abstract**

Fruit abscission usually occurs at the final stage of fruit maturation. However, in some areas of citrus production it may occur well in advance of the usual harvest period and thereby cause fruit loss. The impact of the environment and/or the fruit parameters on the fruit abscission process during fruit maturation remains unclear. To investigate the reasons for the sudden intense fruit abscission, a multi-site study was carried out in Corsica, Spain and Tunisia on six orange varieties known to have different periods of maturity. A sudden massive fruit drop occurred in Tunisia and Spain in February-March but not in Corsica. Climatic parameters were recorded at the three sites along with fruit quality criteria and the fruit detachment force (FDF) during the last stage of fruit maturation. The FDF decreased in Tunisia and in Spain, whereas in Corsica, it remained constant throughout fruit maturation, whatever the orange varieties. As expected, data on fruit quality parameters differed at the three sites, but their evolution was similar during the period of maturation. FDF was not related with changes in any fruit quality parameters, and more likely depended on changes in climatic factors such as variations in temperature on days when the temperature was above 13°C, which is the threshold for vegetative growth. Massive fruit abscission could be linked to the earlier more rapid restart of vegetative growth in Tunisia and Spain than in Corsica.

**Keywords:** citrus, fruit abscission, fruit maturation, environmental effect, growing degree days

## **Introduction**

Citrus is the largest fruit crop produced in the world. In the orchard, citrus production is challenged by multiple biotic and abiotic stress factors (Syvertsen and Levy, 2005; Terol et al., 2007). Biological fruit development processes are controlled in time and in space by internal factors like genetics, and external factors such as rootstock, nutrition and agricultural practices (Jacquemond et al., 2013). Soil and climate also have a considerable influence (Patt et al., 1966) and the physiological processes related to tree and fruit development, fruit yield and fruit metabolite contents vary with the production area, each of which is characterized by different environmental factors (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996).

Maturation involves numerous biochemical and physiological changes within the fruit that subsequently affect its commercial quality (Bain, 1958). Fruit external quality is usually characterized by size, rind color and firmness (Iglesias et al., 2007; Tadeo et al., 2008). Internal quality is evaluated by acidity, sugar content, juiciness, pulp color, and aroma (Soule and Grierson, 1986). In mandarins and related varieties such as clementines or oranges, rind color and pulp acidity are the criteria that are the most affected during maturation. After increasing during the second phase of fruit development called ‘fruit enlargement’, acidity declines during the third and last stage called ‘fruit maturation’ (Iglesias et al., 2007). Changes in total soluble sugars (TSS) differ from those in acidity, with a slight increase during the maturation phase (Roongruangsri et al., 2013). The ratio between total soluble sugars and acidity is the main indicator of fruit maturity and is usually used to select the harvest period (Baldwin, 1993). The same variety of fruit produced in tropical areas differs greatly from the same variety grown under Mediterranean climates (El-Otmani et al., 2011). Many studies have analyzed the influence of environmental factors on external and internal fruit quality criteria such as peel color, fruit size, carotenoids, and sugar or acid contents (Kimball and Box, 1984; Barry and van Wyk, 2006; Dhuique-Mayer et al., 2009; Chelong and Sdoodee, 2013). Other studies showed that the maturation of citrus fruit is impacted by climatic factors such as temperature, relative humidity and luminosity (Reuther et al., 1973; Goldschmidt, 2000).

During fruit maturation, and especially by the end of this process, fruit abscission takes place only in certain citrus cultivars. Abscission is a complex organized and regulated process, defined as cell separation events by which plant organs shed (Niederhuth et al.,

2013). It is activated by developmental, hormonal, and environmental signals. Climatic factors have been proposed to modulate citrus fruit abscission by influencing their internal metabolism (Addicott, 1968). Cell separation during organ abscission appears to be mediated by hormones like ethylene, which has been shown to accelerate this phenomenon (Brown, 1997). Auxins have a dual effect: at the beginning of abscission they act as inhibitors, but once the process has been initiated, auxins tend to promote abscission (Tadeo et al., 2008). Although hormones have been shown to be involved in the abscission process, other parameters are also thought to regulate the phenomenon. Fruit shedding is thought to be triggered by stimuli either as a result of natural senescence or by external factors such as temperature, water stress, or diseases (Estornell et al., 2013; Iglesias et al., 2007; Racskó et al., 2007). These stimuli could trigger internal signals such as a decrease in endogenous auxins and an increase in ethylene production, thereby causing organ abscission (González-Carranza et al., 1998; Taylor and Whitelaw, 2001). Abscission of mature fruit before the harvest period, also called preharvest abscission, is a serious problem, mainly in sweet oranges and Navel group is particularly sensitive to preharvest abscission, which causes fruit loss in many citrus production areas (El-Otmani et al., 1990; Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996; Tadeo et al., 2007). The reasons and the different factors responsible for the high sensitivity of Navel oranges have not yet been identified, although Tadeo et al. (2007) suggested that TSS accumulation during the maturation stage could be a triggering signal involved in the control of the orange abscission.

To identify the internal and external factors leading to orange abscission, changes in fruit characteristics including those in fruit components and in the pedicel retention force were monitored during the late maturation phase in three different environments along the Mediterranean rim: Corsica, Spain and Tunisia.

## **1. Materials and Methods**

### **1.1. Plant material**

The first experiment was performed in Corsica during fruit set in the 2011-2012 season on different orange varieties (*C. sinensis* (L.) Osb.). Three early orange varieties ('Salustiana', 'Navelina', 'Hamlin'), three mid-season varieties ('Washington navel', 'Shamouti', 'Moro') and three late varieties ('Navelate', 'Valencia late', 'Maltaise blonde') were used. All the cultivars were grafted onto Carrizo citrange (*C. sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* Raf.), cultivated in the same orchard, and shared the same growth and soil

conditions. Differences among cultivars were thus not influenced by soil and climatic factors or cropping techniques. Measurements began in December (around 200 days after anthesis).

The second experiment was carried out in the following fruit set season (December 2012 to June 2013) in three different environments, in Corsica, Spain and Tunisia. Two early ('Navelina', 'Newhall Navel'), two mid-season ('Washington Navel', 'Maltaise demi-sanguine') and two late ('Navelate' and 'Lane late') maturing orange cultivars were investigated. The experiments were conducted in irrigated orchards at the INRA-CIRAD citrus Germplasm Bank in Corsica (France, 42.1°N, 9°E), at the *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias* (IVIA) in Valencia (Spain, 39,4°N, 0.3°W) and in the "*Société Tunisienne de l'Agriculture Moderne*" (SOTAM) in Tunis (Tunisia, 37°N, 11°W).

In Tunisia, the varieties were grafted onto sour orange (*C. aurantium* (L.)) rootstock and in Spain and Corsica varieties were grafted onto 'Carrizo' citrange.

Samples were regularly harvested from December 2012 to July 2013. Ten to twelve fruits were collected from three trees of each variety. Fruit were randomly selected all around the canopy approximately 1.5 m from the ground.

Anthesis occurred during the first, second and fourth week of April in Tunisia, Spain and Corsica, respectively. Because anthesis occurred at different dates, the same number of days after anthesis at the three sites correspond to different calendar dates.

## **1.2. Climatic data**

Daily climatic data (mean temperatures, global solar radiation, total rainfall and wind speed) were recorded by an agro meteorological weather station located at each site.

Citrus fruit maturation is closely related to thermal summation (Reuther et al., 1973; Stenzel et al., 2006). Depending on the plant investigated, degree days provide estimations of rates of activity of biochemical processes as well as plant growth. This calculus is used to predict tree life cycle, phenological stage, harvesting time and also pest activity (Harcourt, 1981). It is defined as the sum of mean daily temperatures above a base temperature and below a maximum threshold temperature (Stenzel et al., 2006). In citrus, root, shoot and fruit growth and development slow down considerably below 13°C (Bevington and Castle, 1985) and above 36°C (Mendel, 1969). In our study, these temperatures were thus used as thresholds, and temperatures below 13°C and above 36°C were discounted when calculating

degree days. To calculate growing degree days, we used the formula proposed by (Hutton and Landsberg, 2000):

$$\text{Growing degree days} = [(T_m + T_n)/2] - 13^\circ\text{C};$$

where  $T_m$  is maximum air temperature and  $T_n$  is minimum air temperature. In addition to growing degree days, the numbers of days below  $13^\circ\text{C}$  per month were calculated.

## **2.2. Soil conditions**

Soil conditions differed among the three sites. Soils in Tunisia and in Spain was calcareous and the soil pH was about 8.5 and 8 respectively. However in Corsica, the soil was acid with a pH varying from 6 to 6.5. In terms of texture, Corsican soil is alluvial and fersiallitic. In Spain, and in Tunisia, the soil is sandy loam.

## **2.3. Evaluation of external and internal fruit quality**

Fruit samples were periodically analyzed for quality traits including weight, color, firmness, juice percentage, total soluble solids (TSS), acidity (TA) and maturity index (TSS/TA). An analytical balance was used to weigh the fruit and weight is expressed in grams. The equatorial diameter and the peduncle thickness were measured using a digital caliper (Mitutoya, Absolute digimatic) and dimensions are expressed in centimeters. In Tunisia and Corsica, firmness was recorded with a digital penetrometer (Agrosta® 14) and in Spain with a texturometer (INSTRON texturometer 3343). The color of the fruit rind was measured with a CIE  $L^*a^*b$  under Hunter Lab colorimetric system using a Minolta CR-200 colorimeter (Minolta, Ramsey, NJ USA) at four points around the equatorial plane of the fruit. Using these color parameters, a citrus color index ( $\text{CCI} = 1000 \times a / (L \times b)$ ) was calculated (Jiménez-Cuesta et al., 1982). Negative values of CCI mean green, positive values close to zero yellow and high positive values mean reddish-orange. Fruit juice was extracted with an electric juice extractor, filtered and immediately analyzed. The total acidity of the juice, determined by titration using 0.1 N NaOH, was used as an indirect measurement of the citric acid content and is expressed as grams of citric acid per 100 g of juice. The soluble solid content was determined using a digital refractometer (RFM710) and is expressed as °Brix. These quality attributes were measured in the laboratory at ambient temperature.

## **2.4. Measurement of the Fruit Detachment Force (FDF)**

In citrus, abscission of mature fruit takes place at the so called abscission zone-C (AZ-C) located in the calyx between the fruit pericarp and the floral disc (Goren, 1993). The force needed to separate the fruit from the calyx (the fruit detachment force, FDF) indicates how strongly the fruit is attached to the tree. The FDF was measured every 15 days using a pull-force gauge (Compact Gauge, Mecmesin) on samples of 10 fruits with a 10 cm long pedicel collected from three different trees. The FDF is expressed in Newton (N).

## **2.5. Statistical analyses**

Data were analyzed using Statistica10 and R software. FDF and fruit phenotypical data were subject to analysis of variance using Newman-Keuls test for means separation. This test was performed using 10 to 12 reps. In addition, simple correlation analysis was performed using Spearman rank correlation coefficient to investigate relationships between the FDF and fruit characteristics.

## **3. Results**

### **3.1. Comparison of fruit detachment force in Corsica, Spain and Tunisia**

The date of anthesis was used as the reference date to plot abscission kinetics and changes in fruit parameters.

The fruit detachment force (FDF) was monitored throughout the maturation period in ‘Navelina’, ‘Washington navel’, ‘Maltaise demi-sanguine’ and ‘Navelate’ at the three sites (Fig.1). From day 220 to day 300 after anthesis, FDF decreased quite rapidly in Spain and Tunisia. The highest and lowest FDF values for ‘Navelina’, ‘Washington navel’ and ‘Navelate’ evaluated in Spain were 91-111-107 N and 47-51-53 N, respectively. In Tunisia, the initial values (day 230 after anthesis) were below 100 N but decreased during maturation to reach values below 20 N for ‘Washington navel’ and ‘Maltaise demi-sanguine’ (Fig. 1B, C). In Corsica, the initial FDF values were quite low (around 55 N) at day 220 after anthesis and did not change much during maturation, whatever the variety. Indeed at day 438 after anthesis (July 2013), the six orange varieties investigated in the 2012/2013 season, had FDF values higher than 40 N (Fig. A.1.A). Fruit drop occurred at the end of February in Spain and at the end of March in Tunisia (300 and 330 days after anthesis, respectively).

In Corsica some fruit were still attached to the trees 438 days after anthesis (July 2013) while in Spain and in Tunisia almost no fruit remained on the trees by the end of March. Statistical analyses suggested that abscission estimated based on the FDF values differed with the site (Table1). FDF decreased significantly in Tunisia and Spain but not in Corsica (Table 2). Interestingly, previous results obtained in Corsica in the 2011/2012 season showed that trends of FDF curves measured on a set of eight orange varieties were very similar to results obtained in the 2012/2013 season (Fig. A.1.). The FDF of all the varieties investigated remained almost the same during maturation until May, when the last measurement was made. In some varieties including ‘Valencia late’ and ‘Washington navel’, the FDF values measured in May were quite high, 80 N and 60 N, respectively.

Although the FDF measured in Corsica remained constant during maturation, this does not mean that fruit did not drop. In Corsica, fruit shedding is less concentrated in time or at least more spread out over time than in Tunisia and in Spain, where sudden massive fruit drop occurred in the preharvest period.

### **3.2. Soil and climatic conditions in Corsica, Spain and Tunisia**

The climatic data (cumulative degree days, mean temperature, global solar radiation, total rainfall and maximum wind speed) recorded at the three sites are presented in figure 2. Climatic factors differed considerably at the three sites, especially cumulative degree days (Fig. 2A). In October, degree days were higher than 1800°C in Spain and Tunisia, whereas in Corsica, this sum was only reached in June, i.e. eight months later. It is interesting to note that cumulative degree-day plateau was recorded in November at all three sites. Also, close to the preharvest drop period (i.e. day 280 after anthesis), trees cultivated in Spain and Tunisia had reached respectively 400 and 900 degree days more than trees cultivated in Corsica (Fig. 2A). Comparison of the mean temperature at the three sites showed a difference of 3°C to 4°C between Tunisia and Corsica over the year (Fig. 2B). Differences between Corsica and Spain ranged from 0°C to 3°C. During the fruit drop period, the difference in temperature was 3.5°C between Tunisia and Corsica and 4°C between Spain and Corsica.

From April to the end of summer, trees were subjected to the same sum of global solar radiation (Fig. 2C). Later on, at the beginning of fall and until the fruit drop period, about 500 more MJ m<sup>-2</sup> were recorded in Spain than in Corsica and Tunisia (period from September 2012 to March 2013).



From December to March, there were more cold days, i.e., with temperatures below 13 °C, in Corsica than in Spain and in Tunisia (Fig. 2D). From February, the number of cold days decreased rapidly in Tunisia and Spain, whereas in Corsica, the number of cold days only decreased in April.

Rainfall was very irregular especially in Corsica, ranging from 0 to 169 mm, with a maximum in September. In the period from January to March, a second rainfall event was recorded, and rainfall increased from 1 to 143 mm. In Spain and Tunisia, rainfall was similar and did not exceed 60 mm per month from April to August 2012 (Fig. A. 2A). From January to March - which corresponded to fruit abscission period in Spain and Tunisia - rainfall was quite low ( $\leq 40$  mm at both sites). Regarding wind, data showed that wind speeds in Tunisia were never higher than 19 km/h in the 2012/2013 season, whereas wind speeds in Corsica and Spain were much higher in the same period. In Spain, maximum wind speed ranged from 31 to 44 km/h and in Corsica wind speed reached more than 61 km/h in October and February (Fig. A. 2B).

### **3.3. Comparison of fruit quality attributes and their evolution during the fruit maturation and fruit drop period**

#### **Fruit weight, firmness and color index**

Increase in firmness was monitored in 'Navelina', 'Washington navel', 'Maltaise demi-sanguine' and 'Lane late' at the three sites (Fig. 3A, B, C, D). Fruit enlargement did not change from day 200 to day 350 after anthesis, whatever the site and the orange variety, except 'Lane late', which increased slightly in Corsica. Fruit weight tended towards a maximum value (plateau) that differed for each variety. The maximum value of this trait differed between the three sites, particularly for 'Washington navel' and 'Lane Late', but did not affect the general trend in the evolution of this character.

It is worth noting that the differences observed were not correlated with the changes observed in the FDF, which consequently does not appear to play a determining role in changes in fruit weight, firmness and color index at these sites. Firmness was monitored in four orange varieties in Corsica and in Tunisia during the period of fruit maturation (Fig. 3 E, F, G, H). At these two sites, fruit firmness decreased during maturation. Oranges cultivated in Corsica were always less firm than oranges grown in Tunisia. The color index of varieties cultivated in Corsica and Spain increased until 250-280 days after anthesis and then remained constant (Fig 4). In Corsica, whatever the variety, the CCI values of the pericarp were always

slightly higher than in Spain, indicating a more orange-colored rind. In Spain, the color of the fruit rind did not change during fruit abscission (from 270 to 300 days after anthesis).

### **Juice percentage, TSS, acidity and fruit maturity index**

Changes in the juice percentage of ‘Navelina’, ‘Maltaise demi-sanguine’, and ‘Lane late’ orange varieties were also monitored (Fig. 5B). Juice percentage was similar at the three sites and remained constant throughout the maturation period.

Changes in TSS values were similar at the three sites: a slight increase was observed in all the varieties (Fig. 5E, F, G, H). In Corsica and Tunisia, TSS increased during maturation in ‘Navelina’, ‘Washington navel’ and ‘Lane late’ (Table 2). In Spain, TSS increased in ‘Navelina’ and remained constant in ‘Washington navel’ (Table 2).

Acidity decreased during maturation at all three sites but the range of values was bigger in Corsica than in Tunisia and Spain (Table 2). Indeed, acidity values higher than 2 g/100 g of juice were still recorded in ‘Navelina’ in Corsica on day 250 after anthesis. With the exception of ‘Washington navel’, which had the same rate of acidity in Tunisia and in Corsica at the end of maturation, acidity values in oranges cultivated in Tunisia were lower throughout the maturation period (Fig. 5I, J, K, L). The maturity index increased during maturation at all three sites (Table 2), but changed much more rapidly in Tunisia than in Corsica and in Spain in all varieties (Fig. 5M, N, O, P). Indeed, on day 250 after anthesis, the maturity index of ‘Navelina’ was about 20 in Tunisia and continued to increase, while in Corsica and Spain it remained below 5 and 10 respectively, over the same period. In Corsica, changes in the maturity index in ‘Washington navel’ and ‘Maltaise demi-sanguine’ were limited up to day 250 after anthesis, after which it increased rapidly from 8 to 19 for ‘Washington navel’ and from 5 to 10 for ‘Maltaise demi-sanguine’. The maturity index continued to increase in Corsica during the period of fruit abscission, whereas in Spain and Tunisia, it remained constant.

### **Correlations between maturation, the environment, and fruit abscission**

Spearman rank correlation coefficients were calculated to evaluate whether fruit maturation impacts fruit abscission. The Spearman rank correlation coefficients were very low in all the varieties studied in Spain, Tunisia and Corsica (Table 3). Comparison of the TSS and changes in acidity during maturation as well as of changes in FDF showed that TSS and acidity parameters evolved in the same way in the varieties that had a low (respectively high) FDF by the end of maturation (Table 2).

## **4. Discussion**

### **4.1. Impact of the environment on abscission evaluated via changes in fruit traits and in fruit maturation**

Environment-generated variability was observed among the sites in terms of fruit orange weight, firmness, fruit rind color, acidity and TSS. These differences are explained by the influence of environmental factors on fruit quality attributes, as previously documented for fruit size (Marsh et al., 1999), rind color break and color intensity (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996), percentage of fruit juice (Chelong and Sdoodee, 2013), juice acidity, sugar content and TA/TSS ratio Hutton and Landsberg (2000); (Richardson et al., 1997; Utsunomiya et al., 1982). However, in Corsica, differences in fruit maturation did not appear to be associated with the constant FDF. Indeed, in varieties with a similar weight at the end of the experiment (e.g. ‘Navelina’ and ‘Navelate’) in Corsica and in Spain, the FDF decreased only in Spain, even though in Corsica, quality attributes including firmness and the color index did change during maturation. Moreover, the similarity of the juice percentage in the majority of oranges at all three sites suggests no correlation between the accumulation of juice and changes in FDF during maturation. In contrast to our results, Pozo et al. (2007) found a positive correlation between FDF and the juice percentage in mature Valencia orange fruit. In our study, differences in acidity and in the maturity index did not explain the observed differences in FDF. Therefore, FDF was not influenced by the physical fruit traits we investigated (fruit weight, firmness and color index) nor by primary metabolites (TSS and TA and maturity stage TSS/TA). In the oranges we studied at the three sites in the years 2011/2012 and 2012/2013, correlations between FDF and phenotypic traits such as fruit weight, color index, firmness, juice percentage, acidity, TSS and maturity index were mostly not consistent, as evidenced by the mainly non-significant or low Spearman rank correlation coefficients. The low correlations prevent us from demonstrating that fruit maturation has an impact on fruit abscission.

### **4.2. Impact of the environment on abscission**

The results of two studies, one conducted in Spain in 2005/2006 by Tadeo et al. (2007) and the other in Corsica in 2011/2012/2013, suggested that FDF trends are similar over the years at a given site. Therefore, we tried to identify environmental factors that could influence fruit abscission.

The soil characteristics are not the same at our three study sites. To avoid possible abiotic constraints, citrus are grafted onto a rootstock (Praloran, 1971), which affects the physiology of the whole tree (e.g. tree vigor) or fruit quality. Grafting can also increase resistance to biotic and abiotic constraints (Castle et al., 1993) and may promote holding fruit by the tree (Hodgson, 1967). It is possible that the type of rootstock we used may have impacted the changes in FDF. However, in Spain and Corsica, the varieties were grafted on the same rootstock ('Carrizo' citrange) and FDF decreased in Spain whereas it remained constant in Corsica. This suggests that on its own, 'Carrizo' citrange rootstock, cannot explain the difference in the evolution of FDF we observed in Spain and in Corsica. A study by Wirch et al., (2009) showed that in sweet cherry, the type of rootstock could affect fruit quality but not FDF

The orchards used in this study were irrigated to avoid stress caused by a water deficit during the dry period. Consequently, any rainfall that may have occurred did not change the water status of the trees. Furthermore, no water logging, which could have triggered fruit abscission (Iglesias et al., 2007), was observed during the period before fruit shedding. Despite the fact the orchards are surrounded by tree windbreaks to limit the impact of wind on fruit drop, a strong gust of wind can still cause extensive fruit drop (Addicott, 1982; El-Otmani et al., 2011). However, this was not observed during the fruit shedding period in Tunisia. It is important to note that fruit in Corsica were subjected to stronger winds during the abscission period than at the two other sites, and that the fruit remained attached in the tree until July (~ day 438 after anthesis). Thus, rainfall events and wind were ignored as possible factors influencing the citrus fruit drop observed during our experiment.

Addicott (1982) reported that fruit shedding can be affected by several environmental factors such as light and temperature.

In our study, there was no difference in global solar radiation between Tunisia and Corsica all year round, i.e., including the fruit maturation period. So, at two sites with similar global solar radiation, we observed different trends of FDF suggesting that abscission is not affected by this climatic factor.

Temperature and plant development are related by the thermal summation or cumulated degree days the plant needs to reach the maturity (Reuther et al., 1973; Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996). Thus, degree days are quite a good parameter to evaluate fruit maturity. As heat unit influences fruit maturation, we expected cumulated degree days to

influence fruit abscission, as suggested by the observations we made in the present study. However, data analysis failed to confirm this hypothesis. In fact in November, trees grown in Corsica, Spain and Tunisia cumulated 1,400, 1,800 and 2,300 degree days, respectively. Degree day curves then remained constant until February-March and increased thereafter. Thus, one possible hypothesis is that abscission occurs beyond a threshold of 1,800 degree days. Under this hypothesis, fruit would be shed much sooner in Spain and Tunisia. In Corsica, based on the remaining fruit on trees, fruit had been exposed to 1,800 degree days in June, i.e., 13 months after anthesis, and no massive fruit drop or change in FDF was observed. Moreover, in tropical climates with strong light irradiance, such in Reunion Island (at the CIRAD research station in St Pierre) or in the French West Indies (at the CIRAD research station in Capesterre, Guadeloupe), severe orange fruit drop has never been reported. Taken together, these results suggest that the accumulation of heat units cannot be considered to have a direct impact on fruit shedding.

Temperature is known to be a limiting factor for the growth and development of citrus trees. The growth of all citrus tree organs has been shown to slow down below 13°C (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996) and cold hardening starts in citrus at about this temperature (Yelenosky, 1978). In Corsica, citrus trees exposed to a long period with mean temperatures below 13 °C stopped their vegetative development. In Spain and especially in Tunisia, there were fewer days below 13 °C during winter than in Corsica. Concomitantly with fruit shedding, which, in Spain and Tunisia, occurred in February/March, the number of cold days suddenly decreased while temperatures increased and became favorable for vegetative growth. This transition from dormancy to vegetative growth is characterized by high carbohydrate demands in trees that may not be satisfied by current photosynthesis (Bustan and Goldschmidt, 1998). By causing defoliation of the tree, Gómez-Cadenas et al., (2000) showed that nutrient shortage led to fruit abscission, which was promoted by an increase in ABA and ethylene contents. An indirect relation between the increase in temperature and the decrease in FDF can thus be hypothesized. Under this hypothesis, a rapid change from a low temperature to a higher temperature (13°C) at the end of winter would indirectly favor abscission by causing a carbon shortage. Conversely, a longer period of lower temperatures would delay carbon shortage and the decrease in FDF. However, it is important to note that in Corsica, although the change from days below 13°C to days above 13°C occurred in April (i.e. two months later), no massive fruit abscission was triggered. Consequently, other factors are required to explain this phenomenon.

The flowering and fruit set period is characterized by an increase in endogenous plant hormones including auxin, gibberellin (Crane, 1969; Goldschmidt, 1976; Hofman, 1990; Kojima, 1996; Talon et al., 1990) and in carbohydrates (Iglesias et al., 2007; Tadeo et al., 2008). In Corsica, tree flowering and fruit set occur from April to May and coincide with a return to favorable vegetative conditions. In Tunisia and in Spain, the drop in FDF occurs before flowering and fruit set and thus before the associated changes in the hormone balance. This hypothesis is in agreement with the work of Yuan et al. (2003), who showed that a period when mature ‘Valencia’ oranges were resistant to abscission occurred in late April and early May during the harvest season in Florida. These growing young tissues are characterized by a high level of endogenous plant hormones (Hofman, 1990; Plummer et al., 1991). Yuan et al. (2001; 2003) proposed that the lower responsiveness of mature fruit to ethylene application was due to the increase in the concentration of auxin and to the decrease in the concentration of ABA in the abscission zones.

## **5. Conclusion**

Our results suggest that fruit abscission is strongly influenced by environmental factors but not by the maturation parameters we studied. Indeed, the correlations between FDF and fruit attributes were low, suggesting the two phenomena are not related. We thus hypothesize that factors such as carbohydrate shortage or changes in the hormone balance changes are likely associated with the sudden orange drop.

## **Acknowledgements**

This work is part of Hajer Khefifi’s PhD granted by CIRAD and INRA (France) and the University of Carthage (Tunisia). We thank the “*Société Tunisienne de l’Agriculture Moderne*” (SOTAM) for help with the experiments in Tunisia.

## **References**

- Addicott, F.T., 1968. Environmental factors in the physiology of abscission. *Plant physiology* 43, 1471.
- Addicott, F.T., 1982. *Abscission*, illustrée ed, California.
- Bain, J.M., 1958. Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck. *Australian Journal of Botany* 6, 1-23.
- Baldwin, E., 1993. Citrus fruit, In: Seymour, G.B., Taylor, J.E., Tucker, G.A. (Eds.), *Biochemistry of fruit ripening*. Springer Netherlands, England, pp. 107-149.

- Barry, G.H., van Wyk, A.A., 2006. Low-temperature cold shock may induce rind colour development of 'Nules Clementine' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit. *Postharvest biology and technology* 40, 82-88.
- Bevington, K.B., Castle, W.S., 1985. Annual root growth pattern of young citrus trees in relation to shoot growth, soil temperature, and soil water content. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110, 840-845.
- Brown, K.M., 1997. Ethylene and abscission. *Physiologia Plantarum* 100, 567-576.
- Bustan, A., Goldschmidt, E., 1998. Estimating the cost of flowering in a grapefruit tree. *Plant, Cell & Environment* 21, 217-224.
- Castle, W., Tucker, D., Krezdorn, A., Youtsey, C., 1993. *Rootstocks for Florida citrus: rootstock selection, the first step success*, 2nd ed. University of Florida, Inst. Food Agr. Sci., Gainesville.
- Chelong, I.-a., Sdoodee, S., 2013. Effect of Climate Variability and Degree-Day on Development, Yield and Quality of Shogun (*Citrus reticulata* Blanco) in Southern Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 47, 333-341.
- Crane, J.C., 1969. The role of hormones in fruit set and development. *HortScience* 4, 1969-1970.
- Dhuique-Mayer, C., Fanciullino, A.-L., Dubois, C., Ollitrault, P., 2009. Effect of genotype and environment on citrus juice carotenoid content. *Journal of agricultural and food chemistry* 57, 9160-9168.
- El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A., Zacarias, L., 2011. Citrus spp :orange, mandarin, tangrine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime, In: Yahia, E. (Ed.), *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruit*. Woodhead Publishing, Mexico, pp. 437-515.
- El-Otmani, M., M'Barek, A.A., Coggins Jr, C.W., 1990. GA<sub>3</sub> and 2,4-D prolong on-tree storage of citrus in Morocco. *Scientia Horticulturae* 44, 241-249.
- Estornell, L.H., Agustí, J., Merelo, P., Talón, M., Tadeo, F.R., 2013. Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Science* 199, 48-60.
- Goldschmidt, E., 1976. Endogenous growth substances of Citrus tissues. *HortScience* 11, 95-99.
- Goldschmidt, E., 2000. Reassessment of climatic effects on fruit maturation in Citrus towards the development of a fruit maturation and quality model, *Proc. Int. Soc. Citriculture*, pp. 300-302.
- González-Carranza, Z.H., Lozoya-Gloria, E., Roberts, J.A., 1998. Recent developments in abscission: shedding light on the shedding process. *Trends in Plant Science* 3, 10-14.

- Goren, R., 1993. Anatomical, physiological, and hormonal aspects of abscission in citrus. *Hort. Rev* 15, 145-182.
- Harcourt, D., 1981. A thermal summation model for predicting seasonal occurrence of the alfalfa weevil, *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae), in southern Ontario. *The Canadian Entomologist* 113, 601-605.
- Hodgson, R.W., 1967. Horticultural varieties of citrus, In: Reuther, W., Webber, H.J., Batchelor, L.D. (Eds.), *The citrus industry*. Univ. of California Press, Riverside, pp. 431–591.
- Hofman, P.J., 1990. Abscisic acid and gibberellins in the fruitlets and leaves of ‘Valencia’ orange in relation to fruit growth and retention. *Scientia Horticulturae* 42, 257-267.
- Hutton, R.J., Landsberg, J.J., 2000. Temperature sums experienced before harvest partially determine the post-maturation juicing quality of oranges grown in the Murrumbidgee Irrigation Areas (MIA) of New South Wales. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 275-283.
- Iglesias, D.J., Cercós, M., Colmenero-Flores, J.M., Naranjo, M.A., Ríos, G., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Lliso, I., Morillon, R., Tadeo, F.R., 2007. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19, 333-362.
- Jacquemond, C., Curk, F., Heuzet, M., 2013. *Les clémentiniers et autres petits agrumes*, Quae ed, Versailles, France.
- Jiménez-Cuesta, M., Cuquerella, J., Martínez-Javaga, J., 1982. Determination of a color index for citrus fruit degreening, in: Matsumoto, H. (Ed.), *Proceedings of the International Society of Citriculture/[International Citrus Congress, Tokyo, Japan*, pp. 750-753.
- Kijas, J.M.H., Thomas, M.R., Fowler, J.C.S., Roose, M.L., 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theoretical and Applied Genetics* 94, 701-706.
- Kimball, D.A., Box, C., 1984. Factors affecting the rate of maturation of citrus fruits, *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, pp. 40-44.
- Kojima, K., 1996. Changes of abscisic acid, indole-3-acetic acid and gibberellin-like substances in the flowers and developing fruitlets of citrus cultivar ‘Hyuganatsu’. *Scientia horticulturae* 65, 263-272.
- Marsh, K., Richardson, A., Macrae, E., 1999. Early-and mid-season temperature effects on the growth and composition of satsuma mandarins. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 74, 443-451.
- Mendel, K., 1969. The influence of temperature and light on the vegetative development of citrus trees, *Proceedings International Citrus Symposium*. University of California, Riverside, pp. 259-265.



- Niederhuth, C.E., Cho, S.K., Seitz, K., Walker, J.C., 2013. Letting Go is Never Easy: Abscission and Receptor-Like Protein Kinases. *Journal of integrative plant biology* 55, 1251-1263.
- Patt, J., Carmeli, D., Zafir, I., 1966. Influence of soil physical conditions on root development and on productivity of citrus trees. *Soil Science* 102, 82-84.
- Plummer, J.A., Mullins, M.G., Vine, J.H., 1991. Seasonal changes in endogenous ABA and IAA and the influence of applied ABA and auxin in relation to shoot growth and abscission in Valencia Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Plant growth regulation* 10, 139-151.
- Pozo, L., Malladi, A., John-Karuppiah, K.-J., Lluch, Y., Alferez, F., Burns, J.K., 2007. Daily fluctuation in fruit detachment force of 'Valencia' orange is related to time of day, temperature, relative humidity, fruit weight and juice percentage, *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, pp. 41-44.
- Praloran, J.-C., 1971. *Les agrumes*, G.-P. Maisonneuve & Larose ed.
- Racskó, J., Leite, G., Petri, J., Zhongfu, S., Wang, Y., Szabó, Z., Soltész, M., Nyéki, J., 2007. Fruit drop: The role of inner agents and environmental factors in the drop of flowers and fruits. *International Journal of Horticultural Science* 13, 13-23.
- Reuther, W., Nauer, E., Summers, L., 1973. Effects of seasonal temperature regimes on development and maturation of citrus fruits, *Proc. Intl. Soc. Citricult*, pp. 63-71.
- Richardson, A.C., Marsh, K., Macrae, E., 1997. Temperature effects on satsuma mandarin fruit development. *Journal of Horticultural Science* 72, 919-929.
- Roongruangsri, W., Rattanapanone, N., Leksawasdi, N., Boonyakiat, D., 2013. Physico-chemical Changes During Growth and Maturation of Tangerine Fruit cv. 'Sai Nam Phueng' and 'See Thong'.
- Soule, J., Grierson, W., 1986. Maturity and grade standards. *Fresh Citrus Fruits*. Wardowski, WF, S. Nagy, W. Grierson (eds) AVI Pub. Co., Westport CT, 23-48.
- Spiegel-Roy, P., Goldschmidt, E.E., 1996. Reproductive physiology: flowering and fruiting, In: press, C.u. (Ed.), *The biology of citrus*, Cambridge, UK, pp. 70-118.
- Stenzel, N.M.C., Neves, C.S.V.J., Marur, C.J., Scholz, M.B.d.S., Gomes, J.C., 2006. Maturation curves and degree days accumulation for fruits of 'Folha Murcha' orange trees. *Scientia Agricola* 63, 219-225.
- Syvertsen, J., Levy, Y., 2005. Salinity interactions with other abiotic and biotic stresses in citrus. *HortTechnology* 15, 100-103.

- Tadeo, F., Simó, A., Agustí, J., Merelo, P., Fuente, D.J.I., 2007. La abscisión de frutos maduros en naranjos dulces del grupo navel correlaciona con la acumulación de azúcares en el zumo. *Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos*, 393-402.
- Tadeo, F.R., Cercós, M., Colmenero-Flores, J.M., Iglesias, D.J., Naranjo, M.A., Ríos, G., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Lliso, I., Morillon, R., 2008. Molecular physiology of development and quality of citrus. *Advances in Botanical Research* 47, 147-223.
- Talon, M., Zacarias, L., Primo-Millo, E., 1990. Hormonal changes associated with fruit set and development in mandarins differing in their parthenocarpic ability. *Physiologia Plantarum* 79, 400-406.
- Taylor, J.E., Whitelaw, C.A., 2001. Signals in abscission. *New Phytologist* 151, 323-340.
- Terol, J., Conesa, A., Colmenero, J.M., Cercos, M., Tadeo, F., Agustí, J., Alós, E., Andres, F., Soler, G., Brumos, J., 2007. Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC genomics* 8, 31.
- Utsunomiya, N., Yamada, H., Kataoka, I., Tomana, T., 1982. The effect of fruit temperatures on the maturation of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruits. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)* 51, 135-141.
- Wirch, J., Kappel, F., Scheewe, P., 2009. The effect of cultivars, rootstocks, fruit maturity and gibberellic acid on pedicel retention of sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of the American Pomological Society* 63, 108-114.
- Yelenosky, G., 1978. Freeze survival of Citrus trees in Florida. *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress* 1, 297-311.
- Yuan, R., Kender, W.J., Burns, J.K., 2003. Young Fruit and Auxin Transport Inhibitors Affect the Response of Mature Valencia Oranges to Abscission Materials via Changing Endogenous Plant Hormones. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128, 302-308.

**Table 1:** Probability of a site effect on fruit attributes at the three sites (A), in Corsica and Tunisia by the end of January (B) and in Corsica and Tunisia by the end of February (C) in 2012/2013. Data are means (n=12). \*, \*\*, \*\*\* indicate significance levels at  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  and  $P < 0$  respectively.

FDF (N)	Fruit weight (g)	Juice percentage	Firmness (Kg/cm <sup>2</sup> )	TSS (°Brix)	Acidity (g/100g)	Maturity index
<b>(A) Corsica/Spain/Tunisia</b>						
5.9e-08 ***	2.8e-09***	0.001131 **	0.000153***	2.3e-12 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***
<b>(B) Corsica/Tunisia</b>						
5.1e-13 ***	2.2e-13 ***	1.7e-06 ***	0.00010 ***	0.02503 *	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***
<b>(C) Corscia/Tunisia</b>						
5.9e-08 ***	3.6e-09 ***	1.5e-11 ***	0.000180***	1.2e-12 ***	2.2e-05 ***	4.0e-05 ***

**Table 2:** Statistical analysis of variations in parameters during maturation in 2012/2013.

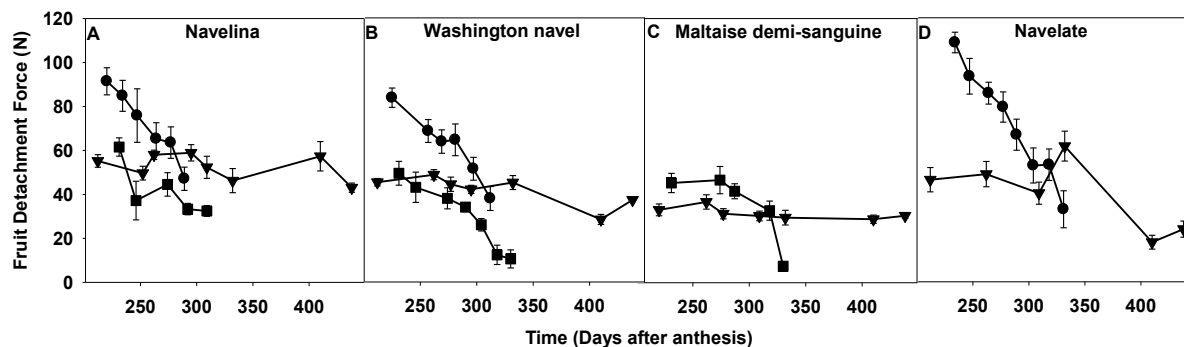
Variety	Date	Fruit weight (g)	Juice percentage	Color index	FDF (N)	TSS (°Brix)	Acidity (g/100g)	Maturity index	Firmness (Kg/cm <sup>2</sup> )
<b>Corsica</b>									
Maltaise ½ sanguine	Date1	175a	43b	81a	44a	9.3a	2.0b	5a	5a
	Date2	222b	38a	49b	41a	9.6a	0.9a	10b	4a
Navelate	Date1	208a	39b	1a	57a	8a	1.9b	4a	6a
	Date2	257b	35a	42b	57a	9.7b	0.7a	14b	5a
Newhall navel	Date1	213a	39b	23a	55a	10.0a	1.3b	8a	8a
	Date2	251b	32a	63b	41a	10.4a	0.6a	17b	4b
Lane late	Date1	325a	37a	-22a	66a	7.5a	1.7b	4a	12b
	Date2	383b	36a	38b	56a	9.4b	0.6a	14b	8a
Navelina	Date1	223a	38b	35a	59a	9.7a	2.3b	4a	6a
	Date2	280b	34a	54b	46a	10.6b	0.8a	14b	4b
Washington navel	Date1	291a	41b	15a	61a	8.2a	1.2b	6a	5b
	Date2	362b	27a	44b	60a	9.4b	0.4a	19b	3a
<b>Spain</b>									
Navelate	Date1	204a	39a	0a	107b	11.1a	1.7b	6a	-
	Date2	221a	39a	9b	53a	13.8b	0.9a	14a	-
Navelina	Date1	251a	37a	11a	91b	12.3a	1.4a	8a	-
	Date2	257a	37a	15b	47a	12.9b	1.5a	9b	-

Washington	Date1	224a	38a	4.6a	111b	11.2a	1.6b	7a	-
navel	Date2	240a	41b	10b	51a	11.3a	1.2a	9b	-
<b>Tunisia</b>									
Maltaise ½	Date1	178a	46b	-	60b	8.3a	1b	8a	10b
sanguine	Date2	181a	43a	-	10a	9.1b	0.9a	10b	6a
Newhall	Date1	197a	47b	-	58b	7.9a	0.7a	13a	9b
navel	Date2	244b	41a	-	14a	9.8b	0.6a	14b	8a
Lane late	Date1	195a	39a	-	112b	9.2a	0.8b	11a	11b
	Date2	247b	38a	-	48a	12.5b	0.5a	18b	10a
Navelina	Date1	184a	40a	-	61b	10.7a	0.5b	19a	7b
	Date2	189a	37a	-	24a	10.8a	0.4a	25b	5a
Washington	Date1	187a	42b	-	66b	10.4a	0.9b	11a	9b
navel	Date2	206a	39a	-	14a	11.4b	0.6a	17b	7a

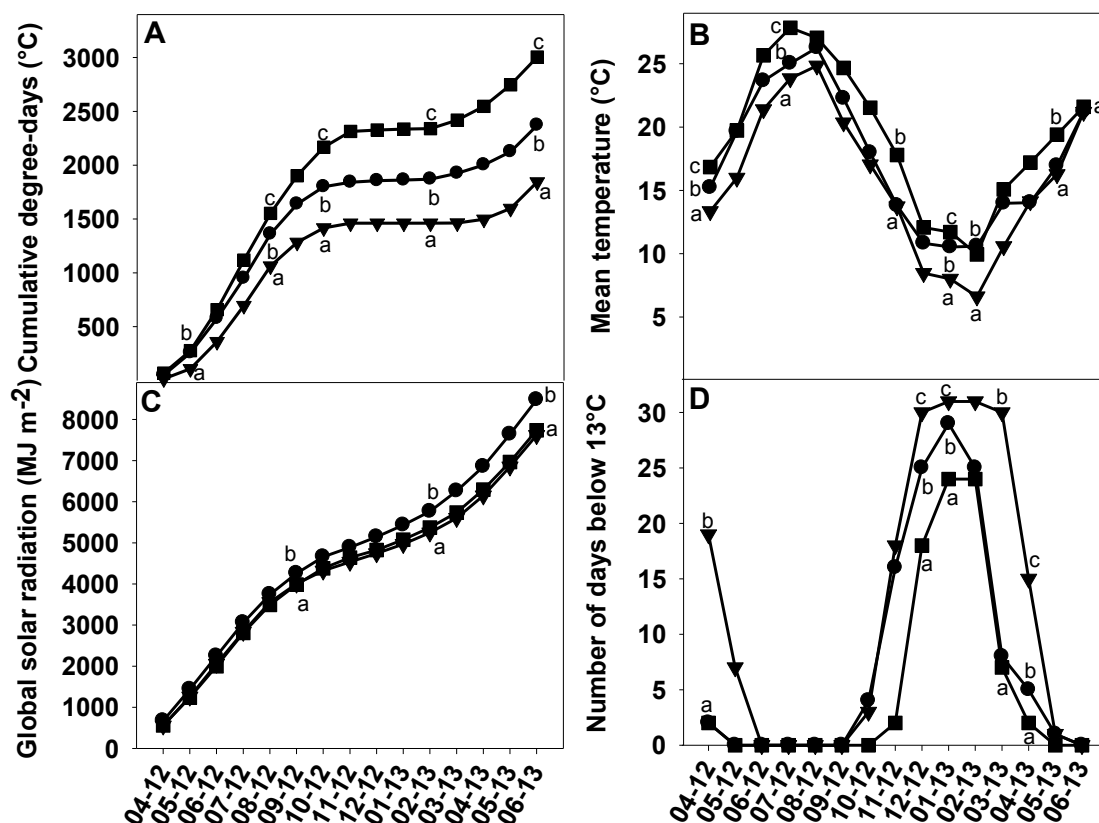
(-) no data shown, Date1: Nov. 21, 2012, Date 2: Feb. 13, 2013

**Table 3.** Spearman rank correlation coefficients between FDF and fruit parameters measured in February 2013 in orange varieties cultivated in Corsica, Spain and Tunisia (values in bold are statistically significant).

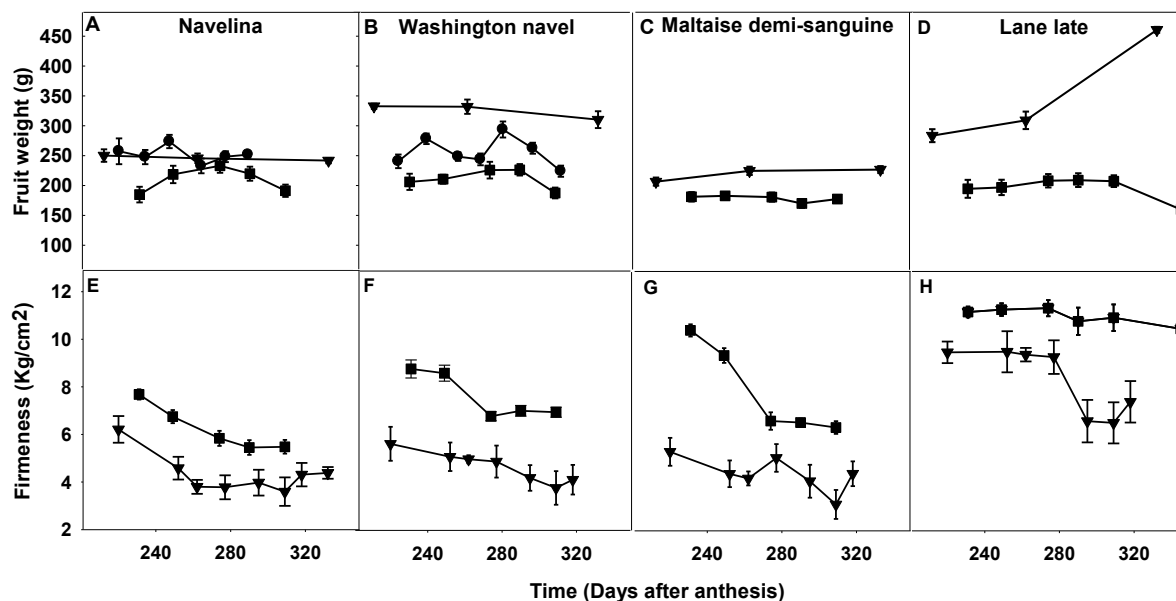
Site	Fruit weight (g)	Juice percentage	TSS (°Brix)	Acidity (g/100g)	Maturity index	Firmness (Kg/cm <sup>2</sup> )	Color index
Corsica	0.05	-0.13	-0.12	0.03	-0.06	<b>0.37</b>	<b>-0.41</b>
Spain	-0.09	-0.03	0.13	-0.29	0.25	-	-0.31
Tunisia	0	0.09	<b>-0.35</b>	-0.04	-0.03	0.38	-



**Fig. 1.** FDF kinetics during fruit maturation in Corsica (▼), Spain (●) and Tunisia (■). FDF was measured in A) ‘Navelina’, B) ‘Washington navel’, C) ‘Maltaise demi-sanguine’ and D) ‘Navelate’. Values are means  $\pm$  SE (n=12). Anthesis occurred in the first, second and fourth week of April 2012 in Tunisia, Spain and Corsica, respectively. Day 250 after anthesis thus corresponds to 01/04/2013 in Corsica, 12/20/2012 in Spain, and 15/12/2012 in Tunisia.

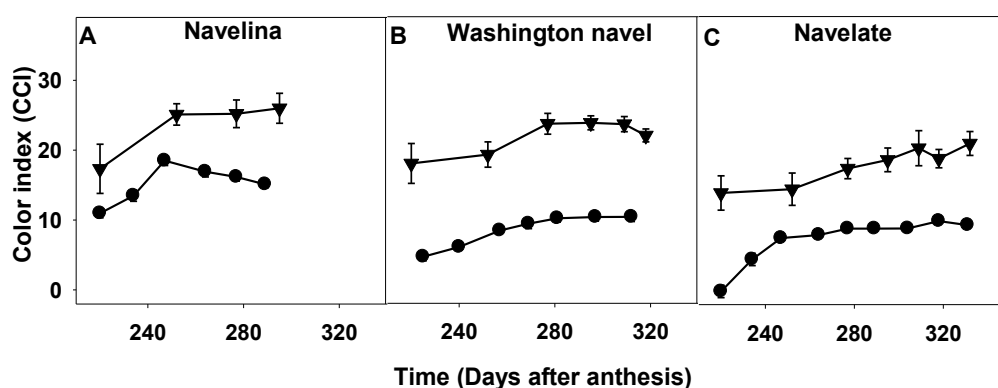


**Fig. 2.** Climatic data recorded during the 2012/2013 season in Corsica (▼), Spain (●) and Tunisia (■). A) Monthly variation in cumulative degree days (°C). B), Mean temperature (°C). C) Global solar radiation (MJ m<sup>-2</sup>). D) Number of days with temperatures below 13°C.



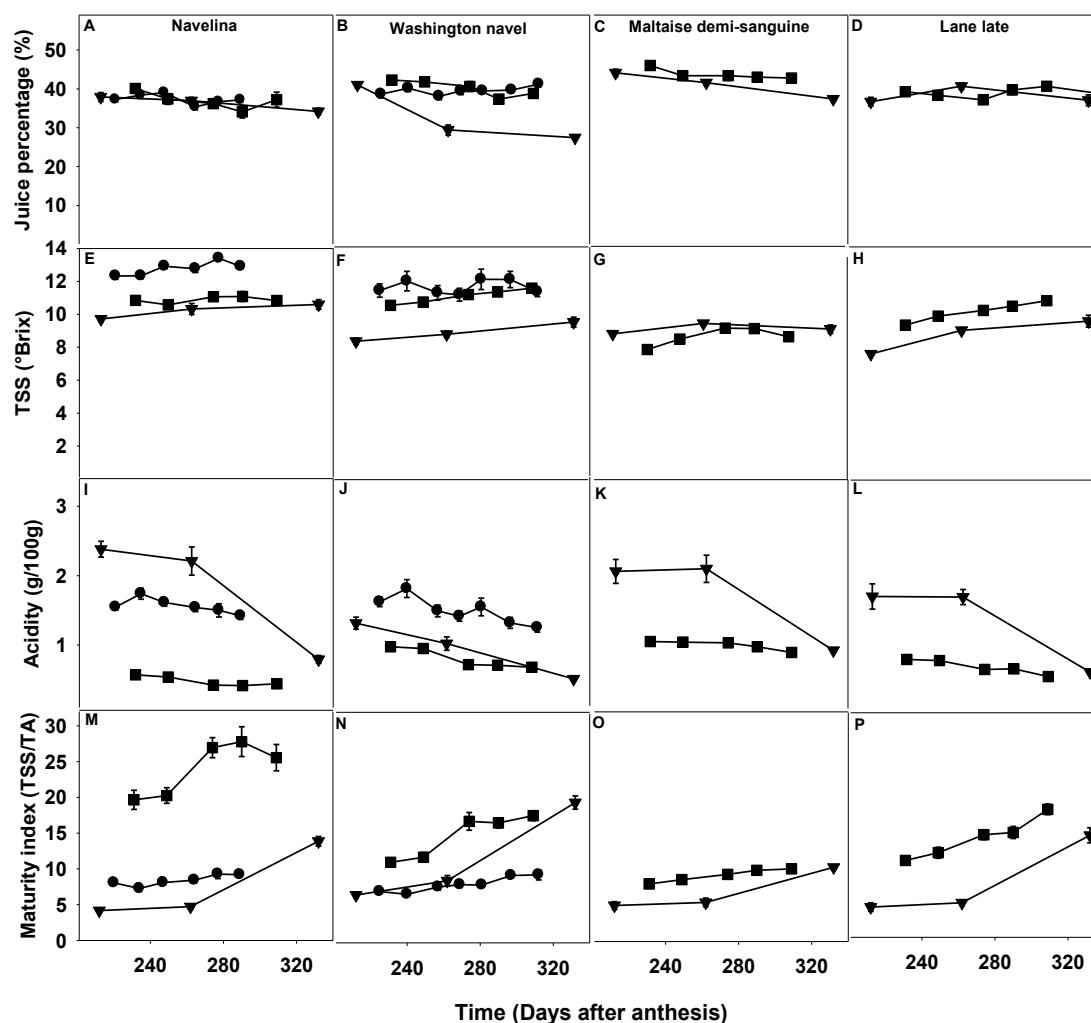
**Fig. 3.** Fruit weight and firmness measured in different orange varieties during maturation in Corsica (▼), Spain (●) and Tunisia (■). Fruit weight was measured in A) ‘Navelina’, B) Washington navel, C) ‘Maltaise demi-sanguine’ and D) ‘Lane late’. Firmness was measured in E) ‘Navelina’, F) ‘Washington navel’, G) ‘Maltaise demi-sanguine’ and H) ‘Lane late’. Values are means  $\pm$  SE (n=12). Anthesis occurred in the first, second and fourth week of April, 2012 in Tunisia, Spain and Corsica respectively.

Day 250 after anthesis thus corresponds to 01/04/2013 in Corsica, 12/20/2012 in Spain, and 15/12/2012 in Tunisia.



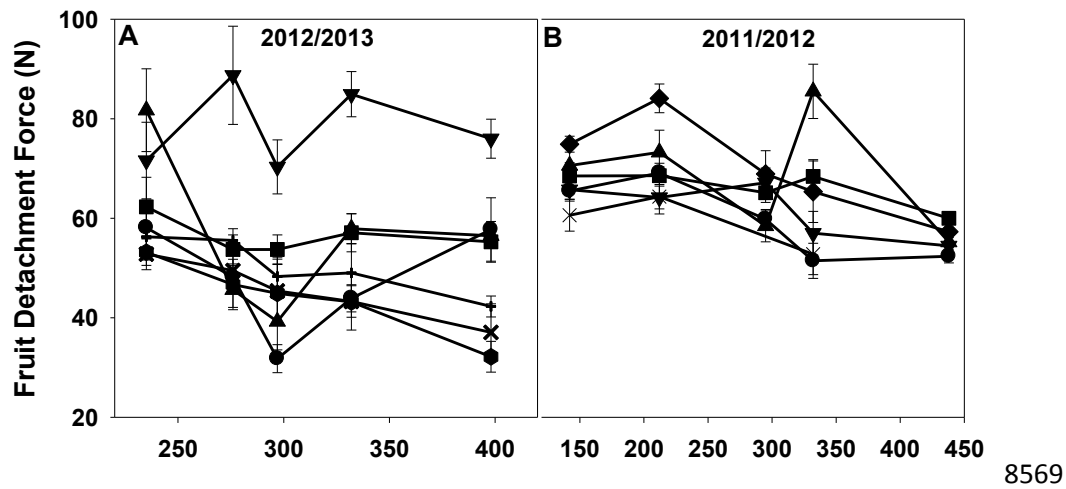
**Fig. 4.** Color index measured in different oranges varieties during maturation in Corsica (▼), Spain (●) and Tunisia (■). The color index was measured in A) ‘Navelina’, B) ‘Washington navel’, C) ‘Navelate’. Values are means  $\pm$  SE (n=12). Anthesis occurred the first, second and

fourth week of April 2012 in Tunisia, Spain and Corsica respectively. Day 250 after anthesis thus corresponds to 01/04/2013 in Corsica, 12/20/2012 in Spain, and 15/12/2012 in Tunisia.

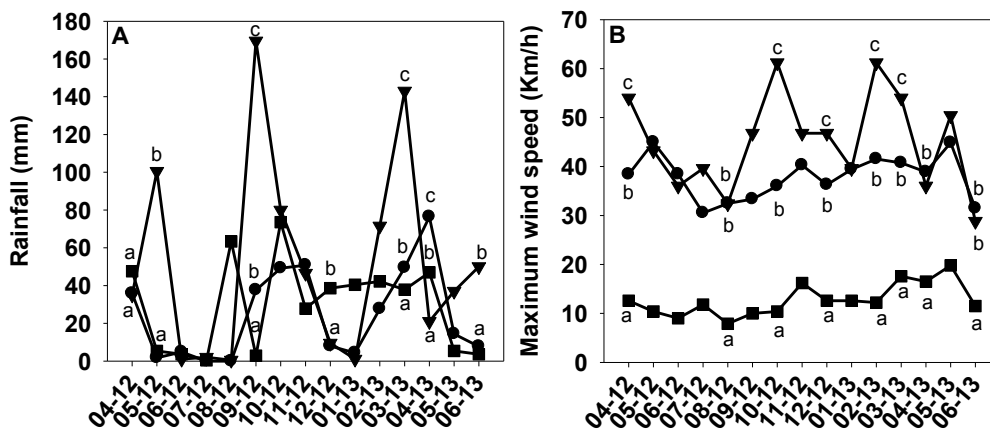


**Fig. 5.** Fruit quality criteria measured in different orange varieties during maturation in Corsica (▼), Spain (●) and Tunisia (■). Juice percentage measured in A) ‘Navelina’, B) ‘Washington navel’, C) ‘Maltaise demi-sanguine’ and D) ‘Lane late’. TSS measured in E) ‘Navelina’, F) ‘Washington navel’, G) ‘Maltaise demi-sanguine’ and H) ‘Lane late’. Acidity measured in I) ‘Navelina’, J) ‘Washington navel’, K) ‘Maltaise demi-sanguine’ and L) ‘Lane late’. The maturity index calculated for M) ‘Navelina’, N) ‘Washington navel’, O) ‘Maltaise demi-sanguine’, P) ‘Lane late’. Values are means  $\pm$  SE (n=12). Anthesis occurred in the first, second and fourth week of April, 2012 in Tunisia, Spain and Corsica, respectively. Day 250 after anthesis thus corresponds to 01/04/2013 in Corsica, 12/20/2012 in Spain, and 15/12/2012 in Tunisia

Appendix



**Fig. A 1.** FDF kinetics in Corsica during fruit maturation in two consecutive seasons. A) In 2012/2013, FDF values measured over time in ‘Maltaise demi-sanguine’ (●), ‘Navelate’ (▲), ‘Lane late’ (◆), ‘Navelina’ (▼), ‘Washington navel’ (■) and ‘Newhall navel’ (×). B) In 2011/2012, FDF was measured over time in ‘Moro’ (◊), ‘Navelate’ (●), ‘Hamlin’ (×), ‘Salutiana’ (■), ‘Shamouti’ (—), ‘Navelina’ (◆), ‘Valencia late’ (▼) and ‘Washington navel’ (▲). Values are means  $\pm$  SE (n=12). Anthesis occurred in the third week of April in 2011 and in the fourth week of April in 2012.



**Fig. A. 2.** Climatic data recorded during the 2012/2013 season in Corsica (▼), Spain (●) and Tunisia (■). A) Rainfall (mm), B) Maximum wind speed (Km/h).



## **Chapitre II**

---

### **Etablissement des cartes génétiques**

## **1. Introduction**

La cartographie génétique permet de caractériser le nombre de chromosomes et leur longueur. Elle représente ainsi un des volets du programme de l'amélioration génétique (Samouelian et Gaudin, 2009). Cette approche est une nouvelle alternative chez les agrumes cultivés pour s'affranchir de certaines contraintes de la reproduction à savoir, l'apomixie, la forte hétérozygotie et la longueur de la phase juvénile et faciliter ainsi les schémas d'amélioration (Ollitrault et Luro, 1995). Néanmoins la cartographie génétique ne permet pas de réduire la phase juvénile mais est un outil pour sélectionner uniquement les hybrides qui présentent le génotype exprimant le caractère souhaité. Cet outil réduit donc les coûts en éliminant les hybrides aux phénotypes inadéquats.

La cartographie génétique a été largement développée chez de nombreuses espèces végétales telles que le blé (Gupta *et al.*, 2002; Hirel *et al.*, 2004), le pommier (Liebhard *et al.*, 2003), la tomate (Tanksley *et al.*, 1992), le poirier (Wu *et al.*, 2014). Cependant, chez les agrumes le développement de cette approche fut plus lent. La première carte de référence d'un agrume n'ayant été publiée qu'en 2012 (Ollitrault *et al.*, 2012).

Les premières cartes développées ont été construites à l'aide des marqueurs dominants et étaient de faible densité. En outre les premières populations étudiées étaient d'effectif restreint et issues de croisements inter-génériques car s'adressaient plus particulièrement à l'amélioration des porte-greffes *via* la recherche de tolérances à des maladies ou à des contraintes abiotiques (Roose, 2007). En revanche, avec les progrès technique et grâce au développement de marqueurs codominants, SSR et SNP, de nouvelles cartes ont été établies. Certaines cartes ont été réalisées à partir de descendances de croisements interspécifiques (Talon et Gmitter, 2008). Néanmoins, leur densité était toujours faible (Ollitrault *et al.*, 2012). La qualité d'une carte d'un génome se juge par sa densité, sa saturation, sa longueur ainsi que par le nombre et le type des marqueurs (Samouelian et Gaudin, 2009). La première carte de référence chez les agrumes a été réalisée dans le cadre d'une coopération internationale émanant du Consortium International de Génétique des Agrumes (ICGC en anglais <http://www.citrusgenome.ucr.edu/>) (Ollitrault *et al.*, 2012). Cette carte a été établie pour le génome du clémentinier à partir de deux populations issues du croisement pamplemoussier x clémentinier et de son réciproque. Les marqueurs moléculaires utilisés furent principalement des marqueurs SNP (plus de 600) mais aussi des marqueurs Indel et SSR. Les marqueurs utilisés (environ 1000) se répartissent sur 9 groupes de liaison, c'est-à-dire autant que de chromosomes de base. La carte peut être qualifiée de saturée. L'espace moyen entre les

marqueurs est égal à 1.13 Cm. Plus tard grâce à l'analyse par ces mêmes marqueurs cartographiés, de la restitution de l'hétérozygotie parentale dans les demie-tétrades à l'origine des diplo-gamètes, a permis de déduire la position des centromères (Aleza *et al.*, 2015).

L'exploitation de l'information génétique contenue dans cette carte devrait permettre de localiser sur les chromosomes des gènes ou des locus impliqués dans des fonctions physiologiques connues. Elle permettra aussi de comparer la structure des génomes d'espèces différentes mais aussi d'analyser la génétique des caractères d'intérêt agronomique.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail qui a pour premier objectif l'élaboration d'une carte génétique des deux parents de la population clémentinier x mandarinier, dont nous avons vérifié la colinéarité des marqueurs par comparaison avec la carte de référence, puis comme deuxième objectif, la détection des QTL associés à des caractères de la qualité des fruits.

## **2. Résultats**

### **2.1. Cartes parentales**

La carte parentale du clémentinier comporte 10 groupes de liaison (GL). Ce nombre s'élève à 15 groupes de liaison chez la carte du mandarinier. Cependant, grâce à la cartographie comparée avec la carte de référence, la position des groupes supplémentaires a été déterminée et sont donc représentés en tant que sous-groupes dans la continuité des groupes de liaison auxquels ils devraient se rattacher s'il y avait eu des marqueurs supplémentaires permettant leur jonction. Les groupes de liaison ont été nommés de façon identique à ceux de la carte de référence (Ollitrault *et al.*, 2012) pour faciliter leur comparaison.

Suite à la suppression des marqueurs qui se co-localisent et ceux dont les génotypes manquants dépassent 50%, 470 et 249 marqueurs polymorphes ont été utilisés sur les 645 initiaux disponibles pour construire la carte du clémentinier et celle du mandarinier qui couvrent respectivement 903 et 826 cM (Figures 25 et 26). Chez la carte du mandarinier, quatre marqueurs n'ont pas pu être cartographiés. Ces marqueurs n'étaient pas liés à aucun des groupes formés. Sur la carte du clémentinier, la longueur minimale des groupes de liaison est celle du groupe 7 qui comporte 20 marqueurs couvrant 65.3 cM. L'intervalle moyen entre les loci varie entre 1.4 et 4.6 cM. Le groupe 8 possède le plus grand intervalle moyen (4.6 cM) ainsi que le plus grand intervalle maximal (19.7 cM). Sur la carte du mandarinier, le nombre de marqueurs par groupe varie de 7 pour le groupe de liaison 7 à 45 pour le groupe de liaison 3 (Tableau 5). La carte du mandarinier présente une densité de marqueurs plus faible

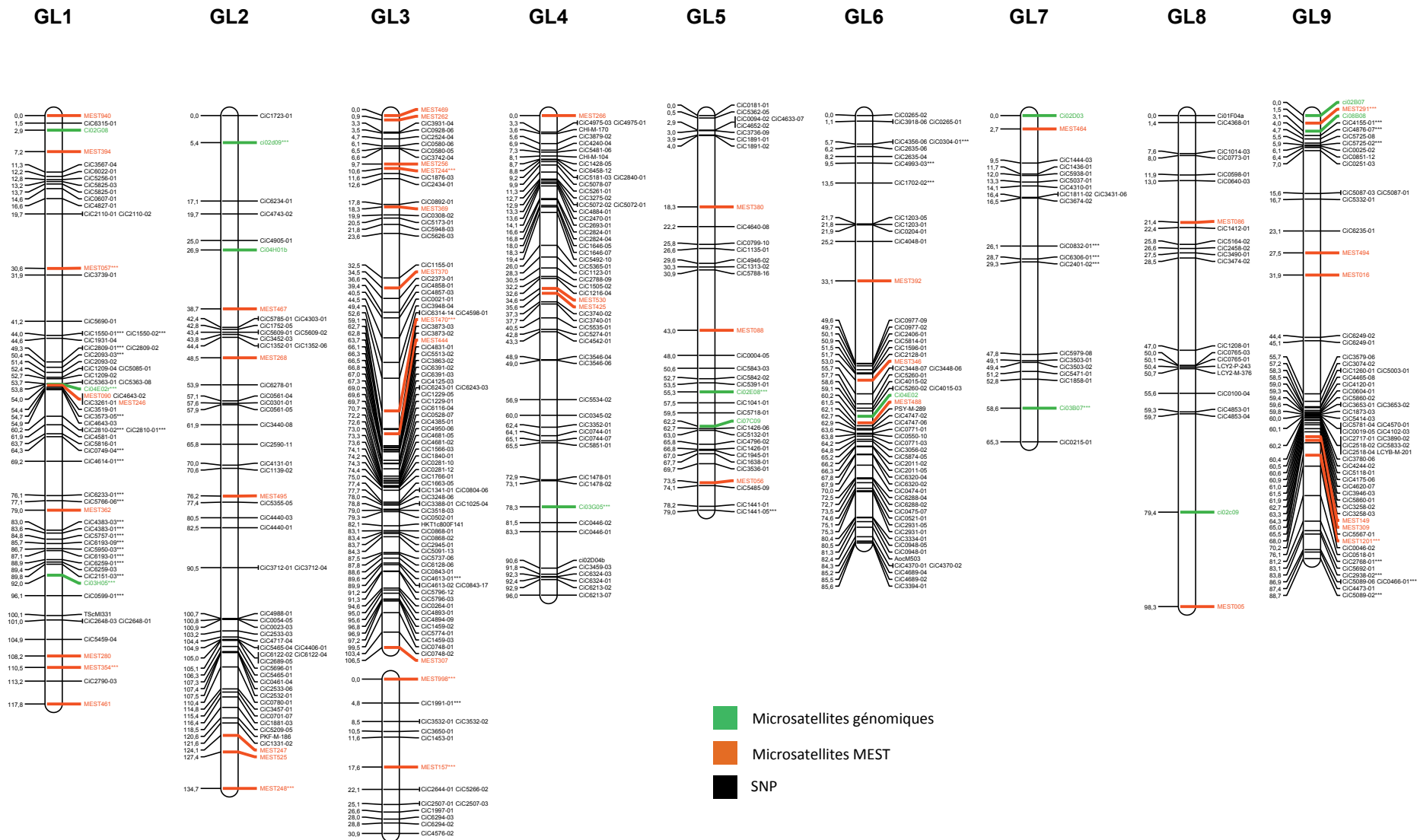
que celle de la carte du clémentinier. En effet, l'intervalle moyen est plus élevé. L'intervalle maximal est observé pour le groupe 7 avec 24.3 cM.

**Tableau 5.** Caractérisation des cartes parentales

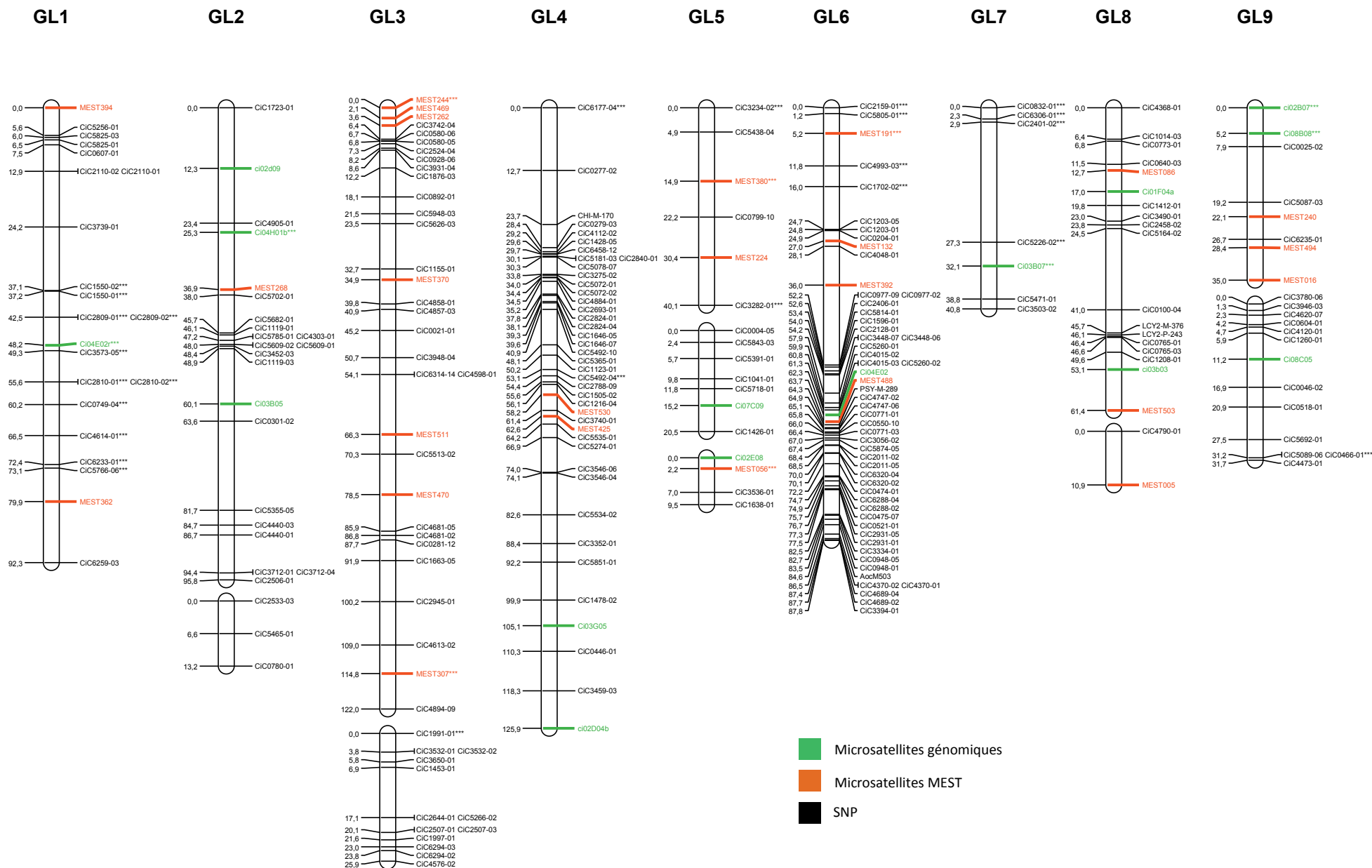
Groupes de liaison	Nombre total de marqueurs	Nombre de marqueurs SNP	Nombre de marqueurs SSR	Longueur du groupe (cM)	Intervalle moyen (cM)	Intervalle maximal (cM)	Intervalle minimal (cM)
<i>Carte du mandarinier</i>							
Groupe 1	22	3	19	92.2	5.1	12.9	0.032
Groupe 2	23	4	19	95.8/13.1	5.1	18.1	0.006
Groupe 3	45	7	38	121.6/25.8	3.5	11.7	0.009
Groupe 4	41	4	37	125.8	3.2	12.7	0.033
Groupe 5	17	5	12	40.1/20.5/9.5	5.0	10.0	2.037
Groupe 6	53	5	48	87.7	1.7	16.1	0.004
Groupe 7	7	0	7	40.8	6.8	24.3	0.586
Groupe 8	20	5	15	61.3/10.8	4.0	16.4	0.124
Groupe 9	21	6	15	34.9/31.6	3.5	11.30	0.039
<i>Carte du clémentinier</i>							
Groupe 1	64	12	52	117.8	1.9	10.8	0.001
Groupe 2	55	5	51	134.6	2.5	11.8	0.005
Groupe 3	97	11	86	106.4/30.8	1.4	8.9	0.009
Groupe 4	56	5	51	95.9	1.7	7.8	0.001
Groupe 5	35	5	30	78.9	2.3	14.3	0.008
Groupe 6	59	5	54	85.5	1.5	16.5	0.004
Groupe 7	20	3	17	65.3	3.4	18.4	0.014
Groupe 8	22	4	18	98.2	4.6	19.7	0.075
Groupe 9	62	8	54	88.6	1.4	12.4	0.003

**Tableau 6.** Nombre de marqueurs classifiés selon le type de locus

Nombre de marqueurs	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	Groupe 6	Groupe 7	Groupe 8	Groupe 9
<b>Carte du clémentinier</b>									
<hkxhk>	22	39	42	34	11	52	6	13	16
<lmxll>	42	16	55	22	24	7	14	9	46
Totale	64	55	97	56	35	59	20	22	62
<b>Carte consensus</b>									
<hkxhk>	18	22	35	34	9	50	5	6	13
<efxeg>	1	2	2	2	2	0	1	3	2
<nnxnp>	1	3	3	2	3	0	0	5	3
<lmxll>	42	38	55	22	23	7	14	9	46
Totale	62	65	95	60	36	57	21	23	64
<b>Carte du mandarinier</b>									
<hkxhk>	21	20	42	39	14	52	7	15	17
<nnxnp>	1	3	3	2	3	1	0	5	4
Totale	22	23	45	41	17	53	7	20	21



**Figure 25.** Carte génétique du clémentinier ; les noms des marqueurs sont indiqués à droite des groupes de liaison, leur type par un code couleur et la distance en cM qui les sépare par rapport au premier marqueur positionné en extrémité supérieure, à droite des groupes de liaison. Les marqueurs à ségrégation distordue sont indiqués par \*\*\*. Un code couleur est attribué au type de marqueur : les marqueurs SSR génomiques sont en vert, les marqueurs SSR MEST sont en orange et les marqueurs SNP sont en noir.



**Figure 26.** Carte génétique du mandarinier ; les noms des marqueurs sont indiqués à droite des groupes de liaison, leur type par un code couleur et la distance en cM qui les sépare par rapport au premier marqueur positionné en extrémité supérieure, à droite des groupes de liaison. Les marqueurs à ségrégation distordue sont indiqués par \*\*\*. Un code couleur est attribué au type de marqueur : les marqueurs SSR génomiques sont en vert, les marqueurs SSR MEST sont en orange et les marqueurs SNP sont en noir.

Parmi les 470 marqueurs cartographiés sur la carte du clémentinier, 235 marqueurs sont de type <hkxhk>, et 235 marqueurs sont de type <lmxll>. Il est à noter que pour les marqueurs avec un profil <hkxhk> nous n'avons pas accès aux taux de recombinaison de chacun des deux parents. Sur les groupes de liaison 1, 3, 5, 7 et 9, le nombre de marqueurs <lmxll> est supérieur à celui des marqueurs <hkXhk>. Un déséquilibre est remarqué entre les deux types de marqueurs situés sur le sixième groupe de liaison. En effet, les marqueurs <lmxll> ne représentent que 13% du nombre total de marqueurs. Sur la carte du mandarinier le nombre de marqueurs est de loin supérieur au nombre de marqueurs <nnxnp>, marqueurs spécifiques à la mandarine. La carte comporte uniquement 22 marqueurs hétérozygotes avec un nombre maximal de <nnxnp> égal à 5 contre 227 marqueurs <hkxhk>. Le septième groupe ne contient aucun marqueur <nnxnp> (Tableau 6).

**Tableau 7.** Codage des marqueurs aux allèles nuls

	A0	B0
AA	-	<lmxll>
AB	<nnxnp>	<nnxnp>
BB	<lmxll>	-
A0	-	<efxeg>
B0	<efxeg>	-

Pas d'observation qui correspond à ce type de configuration

Les allèles nuls ont été retrouvés chez 5 marqueurs de la carte du mandarinier et deux marqueurs de la carte du clémentinier.

## 2.2. Carte consensus

Le nombre total de marqueurs utilisés pour construire la carte consensus est égal à 483 (Figure 27). La carte consensus comporte 10 groupes de liaison.

Il s'est avéré grâce à la cartographie comparée avec la carte de référence, que le dixième groupe de liaison n'est autre que la continuité du troisième groupe de liaison. En termes de couverture du nombre de marqueurs, le groupe 3 est le groupe qui contient le plus de marqueurs. Il comporte 95 marqueurs contre 21 marqueurs seulement pour le groupe 7 (Tableau 8). Chaque groupe de liaison contient les deux types de marqueurs SNP et SSR. Ces derniers représentent un pourcentage qui varie de 6 à 26%. La carte consensus couvre 872.1

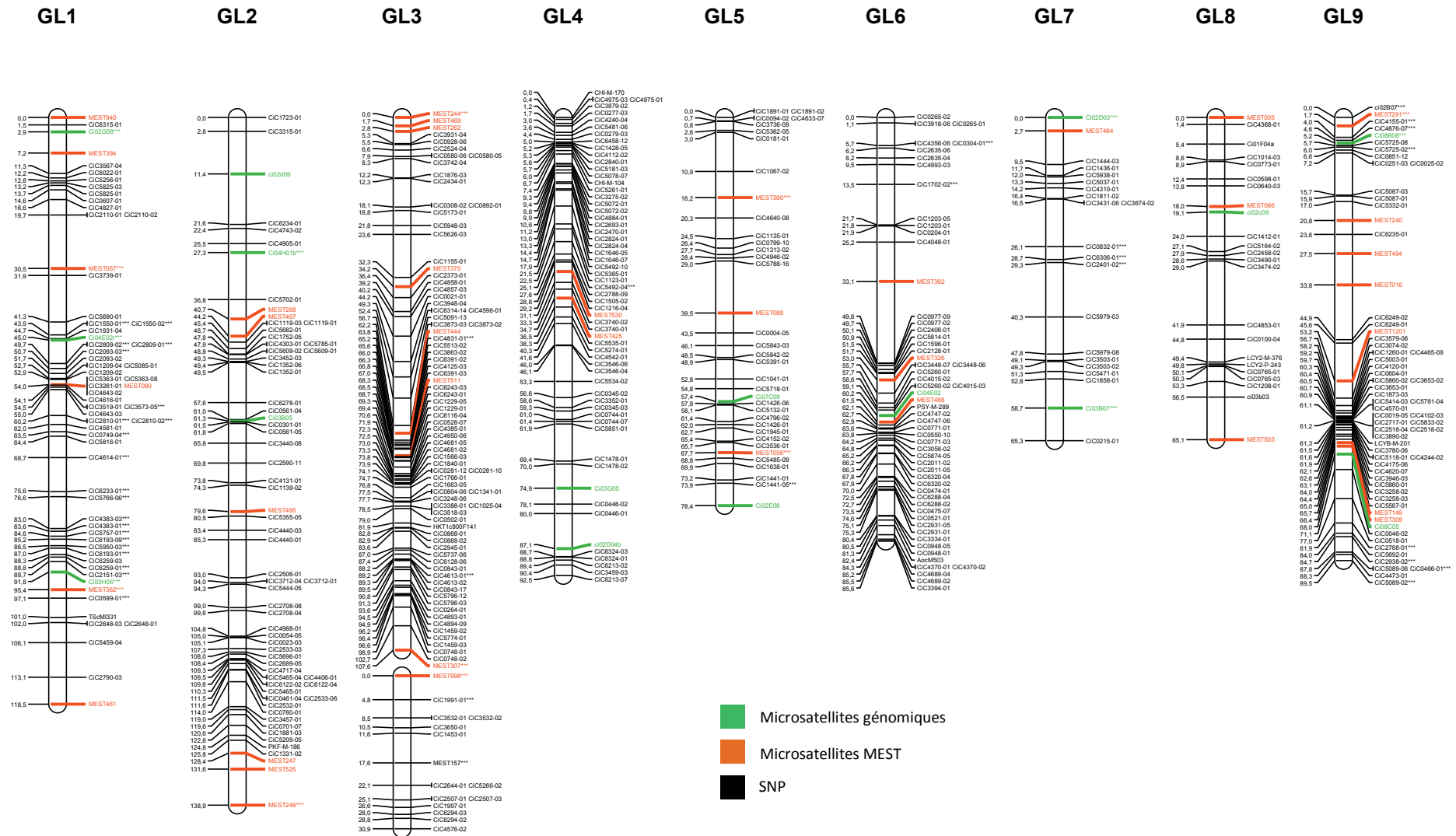


cM. La longueur des groupes est comprise entre 65cM et 138.9 cM. Le groupe 2 correspond au plus grand groupe de liaison. Par ailleurs le groupe 8 est le groupe le plus court. L'intervalle moyen entre les marqueurs positionnés sur un même groupe est inférieur à 5 cM. Il varie, en effet, entre 1.4 à 3.2 cM (Tableau 8). Quant à l'intervalle moyen de l'ensemble de marqueurs positionnés sur la carte consensus est égal à 2.1 cM. A l'exception du groupe 3 et du groupe 6 dont l'intervalle maximal entre les locus est égal respectivement à 20 et 16.5 cM, l'intervalle maximal chez le reste des groupes ne dépasse pas 13cM.

Chez la carte consensus, quatre profils <hkxhk>, <efxeg>, <nnxnp> et <lmxll> ont été identifiés. Parmi les 483 marqueurs polymorphes cartographiés, 291 marqueurs sont hétérozygotes. Les marqueurs ont été répartis comme suit : 192 marqueurs <hkxhk>, 15 marqueurs <efxeg>, 20 marqueurs <nnxnp> et 256 marqueurs <lmxll>. Le nombre de marqueur <nnxnp> varie de 0 à 5 par groupe. Cependant, selon le groupe de liaison le nombre de marqueurs <hkxhk> varie de 7 à 57 marqueurs. Le sixième groupe contient 50 marqueurs homozygotes contre seulement 7 marqueurs hétérozygotes.

**Tableau 8.** Caractérisation de la carte consensus clémentinier et mandarinier

Groupes de liaison	Nombre de marqueurs	Nombre de SSR	Nombre de SNP	Longueur du groupe (cM)	Intervalle moyen (cM)	Intervalle maximal (cM)	Intervalle minimal (cM)
Groupe 1	62	9	53	118.5	2.0	10.8	0.002
Groupe 2	65	5	60	138.9	2.2	10.1	0.003
Groupe 3	95	9	86	107.642/30.9	1.7	20.1	0.006
Groupe 4	60	4	56	92.5	1.5	7.5	0.033
Groupe 5	36	5	31	78.4	2.3	10.5	0.015
Groupe 6	57	4	53	85.5	1.5	16.5	0.004
Groupe 7	21	3	18	65.3	3.2	11.0	0.011
Groupe 8	23	6	17	65.0	2.9	12.8	0.158
Groupe 9	64	10	54	89.5	1.4	11.0	0.001



**Figure 27.** Carte génétique consensus clémentinier et mandarinier. Les noms des marqueurs sont indiqués à droite des groupes de liaison, leur type par un code couleur et la distance en cM qui les sépare par rapport au premier marqueur positionné en extrémité supérieure, à droite des groupes de liaison. Les marqueurs à ségrégation distordue sont indiqués par \*\*\*. Un code couleur est attribué au type de marqueur : les marqueurs SSR génomiques sont en vert, les marqueurs SSR MEST sont en orange et les marqueurs SNP sont en noir.

### **2.3. Fréquence et répartition des marqueurs avec distorsion de ségrégation**

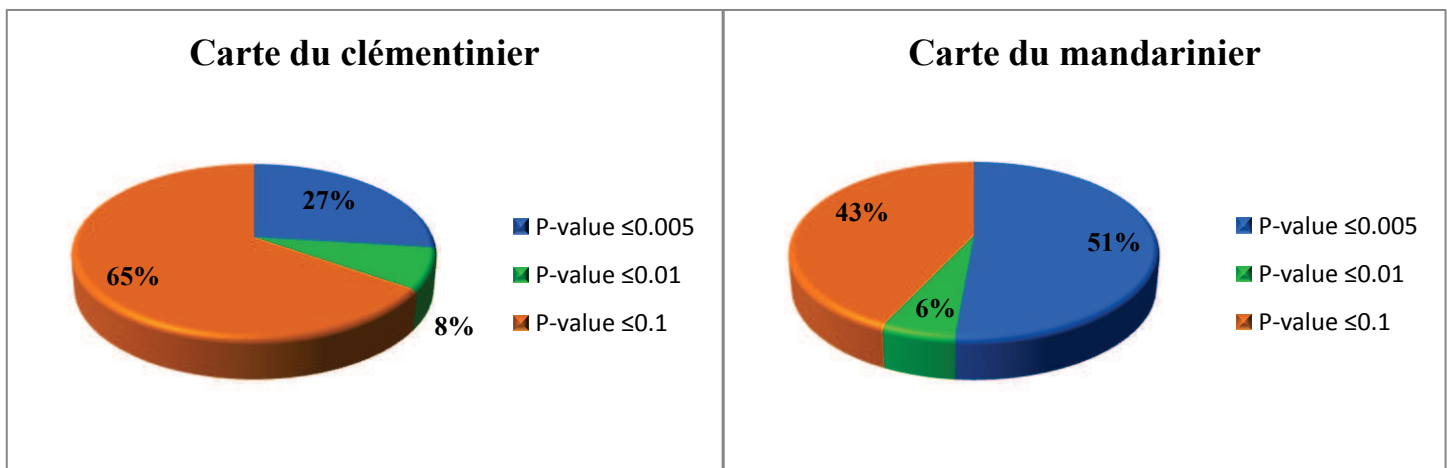
Sur les 470 marqueurs polymorphes chez le clémentinier, 52 marqueurs soit 11%, ségrégent de manière non mendélienne. Parmi ces 52 marqueurs à ségrégation distordue, on compte 9 marqueurs SSR et 43 marqueurs SNP. Ces marqueurs ont été classés en fonction de leur degré de distorsion en allant des marqueurs ayant une faible distorsion avec une p-value  $\leq 0.1$  jusqu'aux marqueurs ayant une très forte distorsion avec un p-value  $\leq 0.005$ . Parmi eux, 63% des marqueurs ont une ségrégation à faible distorsion et 32% à forte distorsion (Figure 28). Sur 249 marqueurs polymorphes et hétérozygotes chez le mandarinier, 14% ont une ségrégation distordue dont 16 marqueurs SSR et 20 marqueurs SNP. La moitié des marqueurs dont la ségrégation n'est pas conforme aux lois mendéliennes, s'écarte fortement de la normalité (Tableau 9).

Dans un premier temps la construction des cartes génétiques a été établie uniquement avec les marqueurs ayant une ségrégation normale. Dans un deuxième temps nous avons utilisé la totalité des marqueurs en intégrant donc aussi les marqueurs ayant une distorsion de ségrégation, et nous avons comparé les deux cartes afin d'évaluer l'effet des marqueurs à ségrégation non mendélienne. Au final, les deux cartes étaient identiques. Le nombre de groupes de liaison, la composition des groupes et l'ordre des marqueurs sur chaque groupe n'ont pas changé. En outre, il est à noter que les marqueurs à ségrégation distordue n'ont pas été non plus supprimés lors de la construction de la carte de référence car n'induisaient aucun changement dans l'ordre des autres marqueurs, qu'ils soient ou ne soient pas considérés (Ollitrault *et al.*, 2012).

La répartition des marqueurs ayant une distorsion de ségrégation ne se fait pas de manière homogène sur tous les groupes de liaison (Tableau 9). Quelle que soit la carte génétique le groupe de liaison 1 est celui qui en comporte le plus et représente de 39.1 à 54.5% des marqueurs à ségrégation non mendélienne selon la carte génétique. Le reste des marqueurs avec ségrégation distordue se répartit sur tous les autres groupes de liaison à raison de 0 à 9 marqueurs par groupe.

**Tableau 9.** Nombre de marqueurs à ségrégation distordue et pourcentage de distorsion de ségrégation sur les trois cartes génétiques

Groupes de liaison	Carte du clémentinier			Carte consensus			Carte du mandarinier		
	Nombre total de marqueurs	marqueurs avec distorsion	% de distorsion	Nombre total de marqueurs	marqueurs avec distorsion	% de distorsion	Nombre total de marqueurs	marqueurs avec distorsion	% de distorsion
Groupe 1	64	25	39.1	62	26	41.9	22	12	54.5
Groupe 2	55	2	4.8	65	2	3.1	23	1	4.5
Groupe3	97	7	7.2	95	7	7.4	45	3	6.6
Groupe 4	56	0	0.0	60	1	1.7	41	3	7.3
Groupe 5	35	2	5.7	36	3	8.3	17	4	23.5
Groupe 6	57	3	5.3	57	3	5.3	53	5	9.4
Groupe 7	20	4	20.0	21	5	23.8	7	5	71.4
Groupe 8	22	0	0.0	23	0	0.0	20	0	0.0
Groupe 9	62	9	14.5	64	9	14.1	21	3	14.3



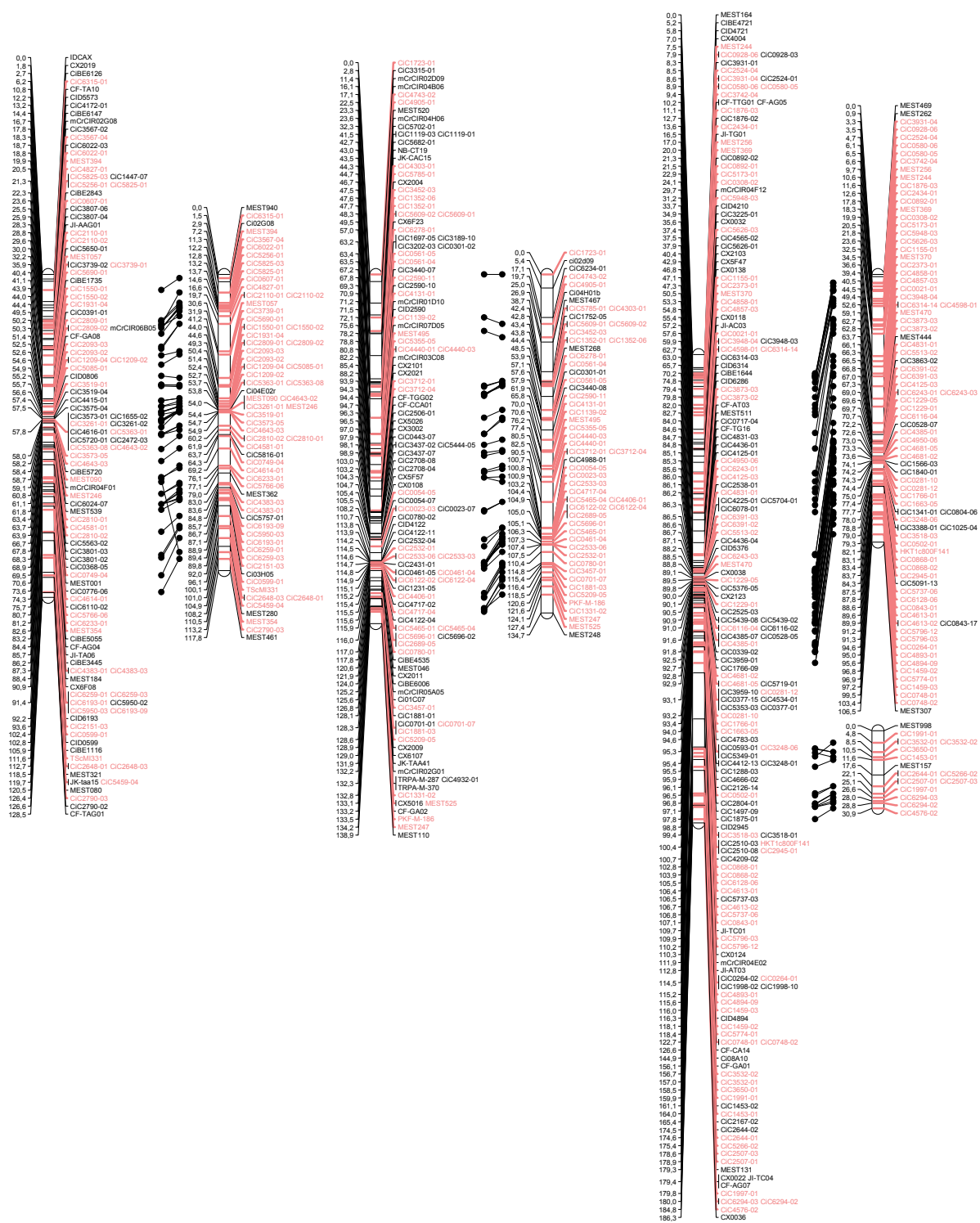
**Figure 28.** Distribution chez les deux génomes parentaux des marqueurs ayant une distorsion de ségrégation. p-value ≤ 0,1 : proportion de marqueurs avec une faible distorsion de ségrégation ; p-value ≤ 0,01 : proportion de marqueurs avec une forte distorsion de ségrégation ; p-value ≤ 0,005 : proportion de marqueurs avec très forte distorsion de ségrégation.

## **2.4. Cartographie comparée**

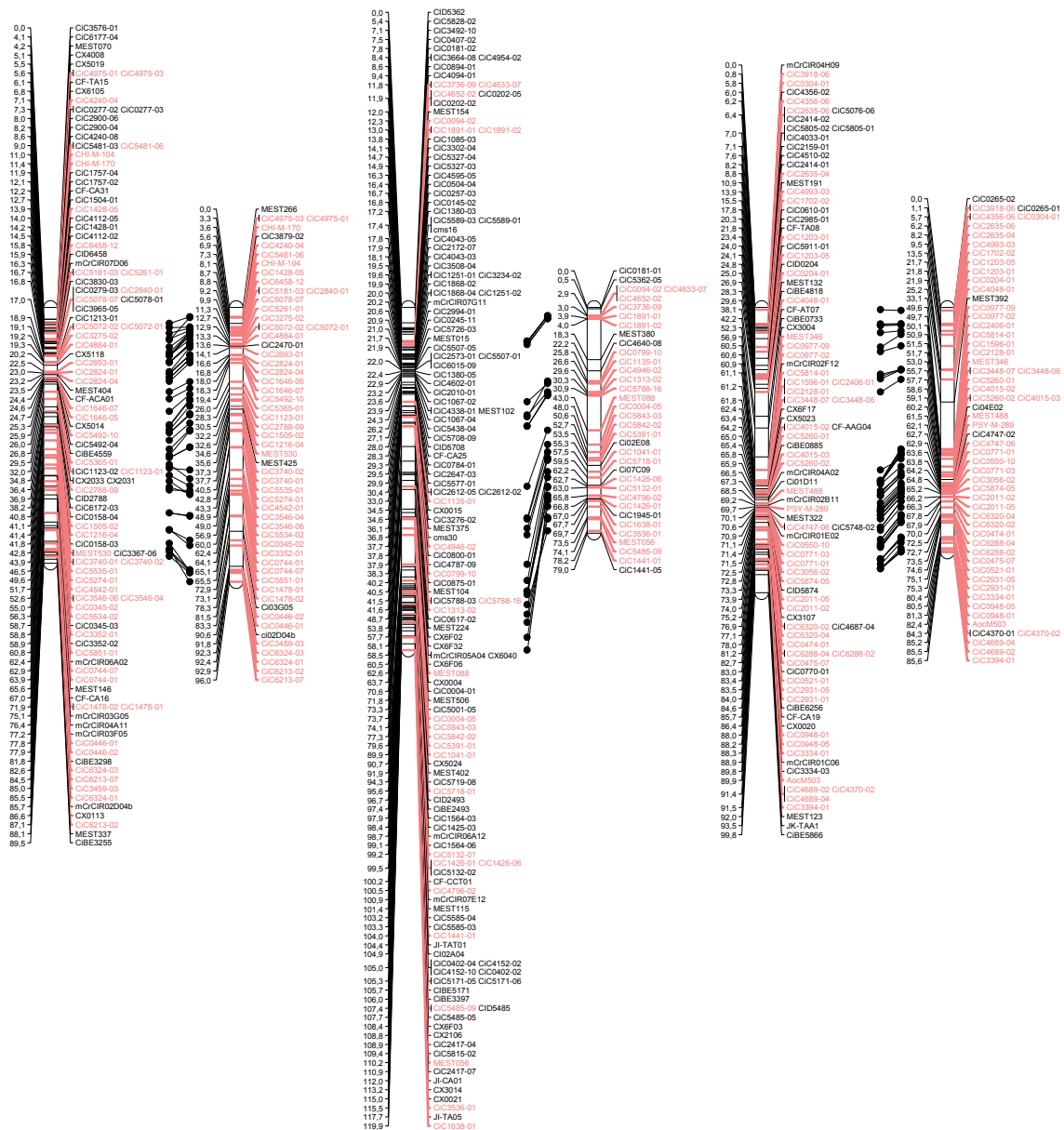
### **2.4.1. Comparaison de la carte du clémentinier avec la carte de référence du clémentinier**

En raison de la différence d'effectif et du type de croisement mais aussi du fait des très nombreux marqueurs en commun, il était nécessaire de comparer la carte consensus obtenue dans la présente étude avec celle de référence Ollitrault *et al.* (2012). Cette dernière a été construite à partir de 961 marqueurs SNP, microsatellites et Indels et à partir de deux populations interspécifiques, pamplemoussier x clémentinier et clémentinier x pamplemoussier. Les deux cartes possèdent 428 marqueurs en commun dont la majorité est des marqueurs SNP. Ce nombre correspond à peu près à 88% et 57% des marqueurs constituants respectivement la carte du clémentinier et la carte de référence. L'étude comparative des deux cartes a permis d'identifier et de placer le dixième groupe de liaison de la carte consensus et de la carte du clémentinier, comme sous-groupe du groupe de liaison 3. Cette comparaison a été aussi utilisée pour aligner les sous-groupes de liaison de la carte du mandarinier. La synténie est conservée car les marqueurs des deux cartes présentent une bonne colinéarité chez tous les groupes de liaison à l'exception de quelques marqueurs. En effet, des petits décalages ponctuels ont été observés dans presque tous les groupes de liaison à l'exception des GL8 et GL9. Ces décalages concernent moins de 5% des marqueurs communs. L'analyse comparative des deux cartes montre également que la carte de référence est plus dense que la carte du clémentinier construite dans notre étude. Cette dernière couvre 872.1 cM alors que la carte de référence couvre 1084.1 cM. Bien que certains groupes de liaisons ne présentent pas beaucoup de différence au niveau de la longueur à savoir les groupes 1, 2, 4, 6 et 9, d'autres groupes tels que les groupes 3 et 7 sont très courts sur la carte consensus comparativement à la carte de référence. En effet, on passe de 79 à 120 cM pour le groupe 5 et de 65.3 à 115.6 cM pour le groupe 7. Chez ces deux groupes, le nombre de marqueurs est faible sur la carte du clémentinier, d'où les grands intervalles entre les loci (Figure 29).

GL1 référence      GL1 clémentine      GL2 référence      GL2 clémentine      GL3 référence      GL3 clémentine



GL4 référence      GL4 clémente      GL5 référence      GL5 clémente      GL6 référence      GL6 clémente



GL7 référence      GL7 clémentine      GL8 référence      GL8 clémentine      GL9 référence      GL9 clémentine

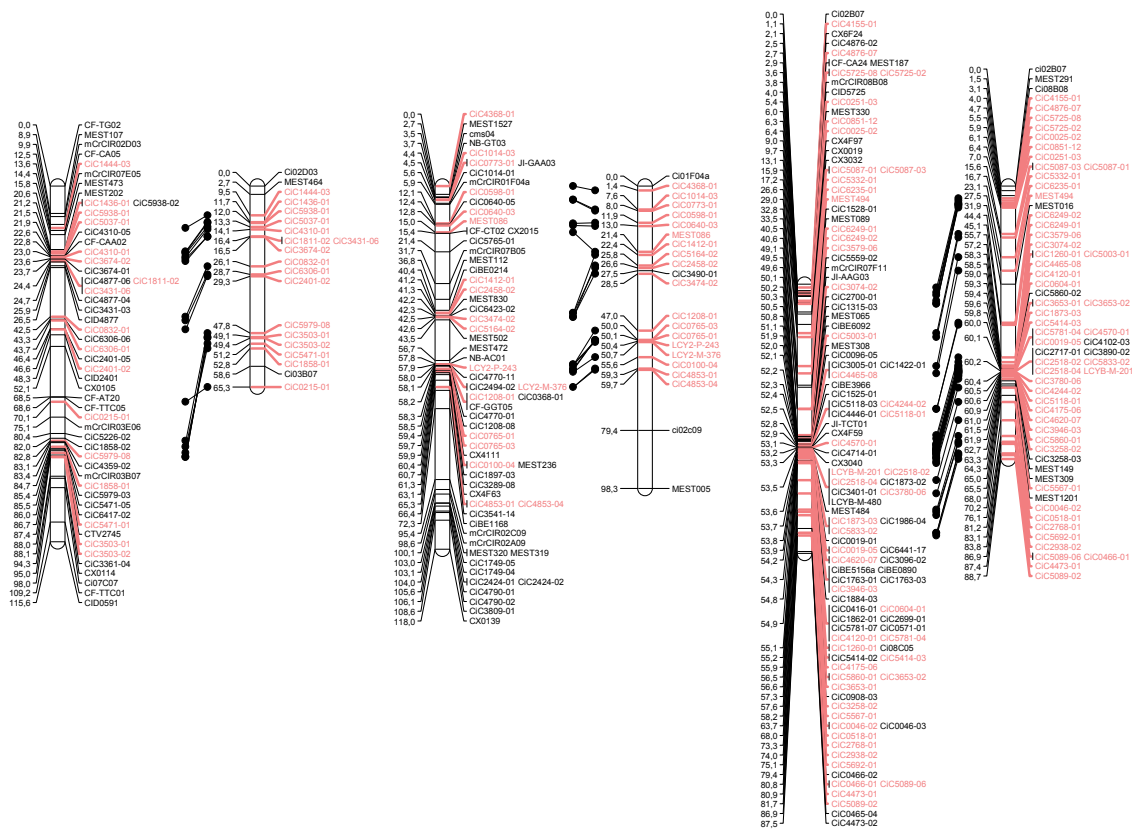


Figure 29. Comparaison de la linéarité des marqueurs de chaque groupe de liaison entre la carte du clémentinier et la carte de référence



### **2.4.2. Comparaison de la carte consensus aux deux cartes parentales**

Certains marqueurs qui avaient pu être cartographiés sur les cartes parentales n'ont pas pu l'être sur la carte consensus et l'inverse est vrai aussi ce qui explique les quelques différences notées au niveau des trois cartes. D'une manière générale, la plupart des marqueurs ont conservé le même ordre. L'analyse comparative entre la carte consensus et la carte du clémentinier, montre que les deux cartes sont très similaires au niveau de la densité, de l'ordonnement des marqueurs et de la longueur des groupes de liaison. En effet, le nombre de marqueurs inversés varie de 1 à 3 marqueurs chez les groupes de liaison 1, 2, 3, 4 et 9. Les groupes de liaison 5 et 8 présentent le nombre le plus élevé d'inversions d'ordre avec 10 et 7 marqueurs non colinéaires respectivement. Un changement d'ordre de tout un lot de marqueurs a été observé au niveau de la partie inférieure du GL 8. Les GL 6 et 7 sont quasiment identiques. Ces deux groupes ont quasiment les mêmes marqueurs à l'exception d'1 marqueur sur le GL 7 et de 2 marqueurs sur le GL 6. La carte consensus est un peu plus dense avec des intervalles un peu plus courts entre les marqueurs que la carte du clémentinier. Cette différence de densité et de répartition des marqueurs est beaucoup plus marquée entre la carte consensus et la carte du mandarinier. Le nombre des marqueurs dont l'ordre n'est pas le même sur ces deux cartes est plus faible que chez la carte consensus et la carte du clémentinier. En effet, ce nombre varie de 1 à 4 marqueurs à l'exception du groupe 6 qui a montré une parfaite colinéarité. Il est à noter aussi que la plupart des groupes de liaison de la carte mandarinier sont souvent composés d'un ou de plusieurs sous-groupes à savoir les groupes 2, 3, 5, 8 et 9 (Annexe 1).

## **3. Discussion**

### **3.1. Distorsion de ségrégation**

La distorsion de ségrégation est souvent rencontrée en cartographie génétique ou lors de l'analyse de caractères quantitatifs (QTL) (Diouf et Mergeai, 2012). Les marqueurs à ségrégation distordue peuvent entraîner des inexactitudes dans la cartographie (Hackett et Broadfoot, 2003) étant donné que les logiciels de cartographie, y compris JoinMap, sont construits sur l'hypothèse d'une ségrégation mendélienne des marqueurs (Diouf et Mergeai, 2012). Pour résoudre ce problème, ces marqueurs sont souvent exclus des analyses conduisant ainsi à une perte d'information génétique suite à la réduction de la couverture du génome (Lorieux *et al.*, 1995). Dans la présente étude, le nombre ou la proportion de marqueurs avec une ségrégation distordue est faible sur la plupart des GL des trois cartes génétiques (moins de 9%), laissant supposer que ces marqueurs n'auraient pas d'impact sur la précision de la carte.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi de faire un test en comparant deux cartes consensus construites avec et sans marqueurs à ségrégation distordue. La comparaison a montré que les marqueurs à ségrégation non mendélienne n'ont pas d'influence sur l'ordre des marqueurs ni sur la longueur des groupes de liaisons. Les marqueurs à ségrégation non mendélienne se concentrent en fait sur le GL1 dans les 3 cartes. Dans notre étude de la distorsion de ségrégation n'a pas affecté la construction de la carte consensus et n'a pas induit de fausses liaisons, ni de faux groupes de liaison conformément aux résultats de la carte de référence (Ollitrault *et al.*, 2012).

La fréquence des marqueurs à ségrégation non mendélienne varie selon le sexe (Ollitrault *et al.*, 2012). Le clémentinier utilisé en tant que parent femelle présente moins de ces marqueurs (13%) que lorsqu'il est utilisé en tant que parent mâle (57%). C'est un peu le cas aussi dans notre population avec un taux néanmoins légèrement inférieur pour le clémentinier (11%) et un taux un peu plus élevé pour le mandarinier (14%). La distribution de ces marqueurs à ségrégation non mendélienne diverge un peu de celle de la carte de référence du clémentinier en tant que parent maternel. En effet la majorité des marqueurs se localise dans les GL5 et GL9 alors que dans notre étude ils se localisent principalement sur le GL1. Néanmoins on retrouve les mêmes marqueurs à ségrégation non mendélienne sur le même GL1 de la carte de référence et de la carte génétique de l'oranger utilisé aussi en tant que parent maternel (Ollitrault *et al.*, 2012). Ces distorsions de ségrégation sont fréquentes dans les études de cartographie génétique des agrumes (Luro *et al.*, 1994; Kijas *et al.*, 1997 ; de Oliveira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2004; Raga *et al.*, 2012). Par ailleurs Bernet *et al.* (2010) rapportaient également leur fréquence plus élevée chez le parent mâle suggérant qu'ils résulteraient d'une sélection gamétique des pollens. Cette sélection gamétique pourrait être liée à différents mécanismes tels que l'avortement ou la compétition pollinique...

D'après Diouf et Mergeai (2012) la cartographie comparée est considérée comme l'une des meilleures méthodes qui permet d'identifier des fausses liaisons. Si les marqueurs à ségrégation distordue n'ont pas affecté la construction des trois cartes génétiques dans notre étude, c'est probablement en raison du faible pourcentage de marqueurs à ségrégation non mendélienne mais aussi à leur type. Il s'agit en fait des marqueurs SNP et microsatellites classés comme marqueurs co-dominants. En effet, plusieurs auteurs ont montré que l'estimation des fréquences de recombinaison entre marqueurs co-dominants est moins

affectée par la distorsion de ségrégation que chez les marqueurs dominants (Lu *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005).

### **3.2. Analyse des cartes génétiques**

La plupart des cartes génétiques publiées chez les agrumes se caractérisaient jusqu'ici par une faible densité de marqueurs (Ollitrault *et al.*, 2012). Dans la mesure où la qualité d'une carte génétique est conditionnée non seulement par le type et le nombre des marqueurs positionnés mais aussi par leur ordre et les distances qui les séparent (Samouelian et Gaudin, 2009), il était important d'utiliser des marqueurs positionnés sur la carte génétique de référence. L'utilisation des marqueurs co-dominants a permis d'évaluer la qualité des cartes génétiques que nous avons établies. Notre carte du clémentinier, fait partie des rares cartes génétiques élaborées chez les agrumes à l'aide des marqueurs co-dominants et à partir d'une population issue d'un croisement intra-spécifique (Ollitrault *et al.*, 2012). Bien que le nombre de marqueurs soit inférieur à celui de la carte génétique de référence, la relative bonne couverture du génome et la répartition des marqueurs devraient permettre une détection de QTL ou de gènes d'intérêt.

La carte du mandarinier couvre 811.5 cM avec 16 groupes de liaison et 249 marqueurs. La non saturation d'une carte se révèle par la présence de nombreux sous-groupes de liaison de petite taille et des marqueurs isolés (de Vienne, 1998). Ceci est dû au nombre relativement faible de marqueurs utilisés pour construire la carte génétique du mandarinier contrairement aux deux autres cartes. Ce même déséquilibre entre les marqueurs spécifiques du mandarinier <nnxnp> et les marqueurs spécifiques du clémentinier <lmxll> a également été observé dans les deux populations pamplemoussier 'Chandler' x clémentinier 'Nules' et clémentinier 'Nules' x pamplemoussier 'Pink' (Ollitrault *et al.*, 2012). Le nombre de marqueurs du clémentinier est plus élevé que celui de pamplemoussiers et du mandarinier, car les marqueurs SNP ont été définis à partir de séquences d'extrémités de clones BAC du génome du clémentinier et qu'ils sont bi-alléliques (Terol *et al.*, 2008 ; Ollitrault *et al.*, 2012). Par ailleurs du fait de son origine hybride interspécifique et de sa filiation avec le pamplemoussier, l'hétérozygotie du clémentinier est plus élevée que celle du mandarinier et donc il est plus aisé de trouver des marqueurs SSR hétérozygotes pour le clémentinier (García-Lor *et al.*, 2012).

### **3.3. Cartographie comparée**

La comparaison de la position et des distances génétiques des 428 marqueurs communs de la carte du clémentinier et de la carte de référence a révélé une bonne synténie.

Une synténie conservée est définie comme la co-localisation préservée des locus génétiques et/ou des gènes sur les chromosomes et /ou les groupes de liaison des espèces apparentées (Samouelian et Gaudin, 2009). Il convient de préciser que la colinéarité est une forme plus spécifique de la synténie conservée qui requiert la co-localisation des gènes avec un ordre génique commun sur un même chromosome chez un individu ou au sein d'une espèce (Abrouk *et al.*, 2010). Alors que la macro-synténie est bien conservée, quelques inversions dans l'ordre des marqueurs ont été observées entre les deux cartes. Par ailleurs, quelques inversions situées essentiellement dans les régions denses ont été également remarquées entre la carte de référence et la carte de l'oranger (Ollitrault *et al.*, 2012). Ces problèmes d'alignement impliquaient le plus souvent des marqueurs proches les uns des autres. Les inversions constatées peuvent être expliquées par des raisons d'ordre statistique: des régions denses en marqueurs telles que les groupes 2 et 4 pour lesquelles l'ordonnement est difficile à obtenir ou des marqueurs situés aux extrémités des groupes de liaison (Ollitrault *et al.*, 2012). Malgré la présence de quelques inversions, la colinéarité est préservée entre les deux cartes. Cette colinéarité est mieux conservée chez la carte consensus que chez la carte du clémentinier dont le nombre d'inversions est un peu plus élevé. Selon Bernet *et al.* (2010) ces inversions sont dues à l'utilisation de marqueurs avec des données manquantes, à des petites erreurs de génotypage et à la différence du pourcentage de distorsion entre les populations comparées.

## ***Chapitre III***

---

### ***Détection de QTL des caractères de la qualité des fruits et de l'abscission***

## **1. Introduction**

L'ensemble des composantes qui donnent naissance aux caractères de la qualité n'est pas seulement dépendant de la manière dont le fruit se développe jusqu'à la maturité mais également du génotype (Knee, 2002). Les caractères du fruit définissant la qualité sont essentiellement des caractères quantitatifs composites qui sont sous la dépendance de plusieurs gènes (Samouelian et Gaudin, 2009). Découvrir les gènes impliqués dans le contrôle de ces caractères de même que l'influence de l'environnement sont donc des enjeux importants pour la recherche fondamentale et pour les travaux de sélection et d'amélioration des agrumes (De Rocca et Ollitrault, 1992).

Ce chapitre concerne donc les travaux réalisés pour révéler et situer sur le génome des QTL impliqués dans le contrôle de l'abscission et des principaux caractères de la qualité au cours de la maturation des fruits.

Pour cela, nous avons construit les cartes génétiques parentales du mandarinier et du clémentinier. Les données de phénotypage des caractères mesurés au cours de la maturation lors des deux campagnes de récolte (2011/2012 et 2012/2013) sont définies dans la section Matériels et Méthodes. La cartographie génétique est présentée dans le Chapitre II. Ce troisième Chapitre est consacré à l'identification des QTL et est subdivisé en deux sous chapitres. Le premier sous-chapitre en français est consacré à l'analyse de données phénotypiques liées aux principaux paramètres de la maturation et d'abscission mesurés en 2011/2012 et à l'identification des QTL associés. Le second sous-chapitre est présenté sous forme d'article en anglais et correspond à l'identification des QTL associés aux caractères physiques et organoleptiques mesurés au cours de la maturation en 2012/2013.

## **2. Détection des QTL de la FDF et des caractères physico-chimiques des fruits**

### **2.1. Résultats**

#### **2.1.1. Analyse des données phénotypiques**

##### **2.1.1.1. Variation des caractères**

La variabilité et la distribution des caractères mesurés à différentes dates de la phase de maturation de la population clémentinier × mandarinier sont présentées dans les figures 30 et 31. Les valeurs moyennes, maximales et minimales et les écarts de chacun des caractères ont été calculés pour les deux parents et pour la population d'hybrides (Annexe 2).

Les deux parents, clémentinier et mandarinier, se différencient sur tous les caractères mesurés à l'exception de la masse et leur écart est à peu près le même tout au long de la période de mesures pour la plupart des caractères (Annexe 2). En effet, pour la force de détachement du fruit (FDF), l'index de couleur CCI, les indices de couleur  $a^*$  et  $b^*$ , la largeur du pédoncule et le pH, le clémentinier présente toujours des valeurs plus élevées, quelle que soit la date de maturation. Par exemple la force de détachement du fruit mesurée en novembre chez le clémentinier est de 43.2 N contre 23.9 N chez le mandarinier. La TSS est plus élevée chez la clémentine les deux premiers mois de mesure puis les deux parents ont une teneur en sucre presque identique. Le pourcentage de jus et l'acidité sont toujours plus élevés chez le mandarinier quelle que soit la date.

Ces écarts et l'évolution dans le temps des valeurs de certains paramètres sont en adéquation avec les époques de maturité commerciale définies pour chacun des deux parents: Novembre pour la clémentine et janvier pour la mandarine. Les clémentines sont donc plus colorées et se détachent moins facilement que les mandarines. Cependant, ces dernières sont plus juteuses et plus acides. Cependant si l'on compare les valeurs mesurées aux époques de maturité commerciales respectives ces différences ne sont pas si grandes, parfois même inversées.

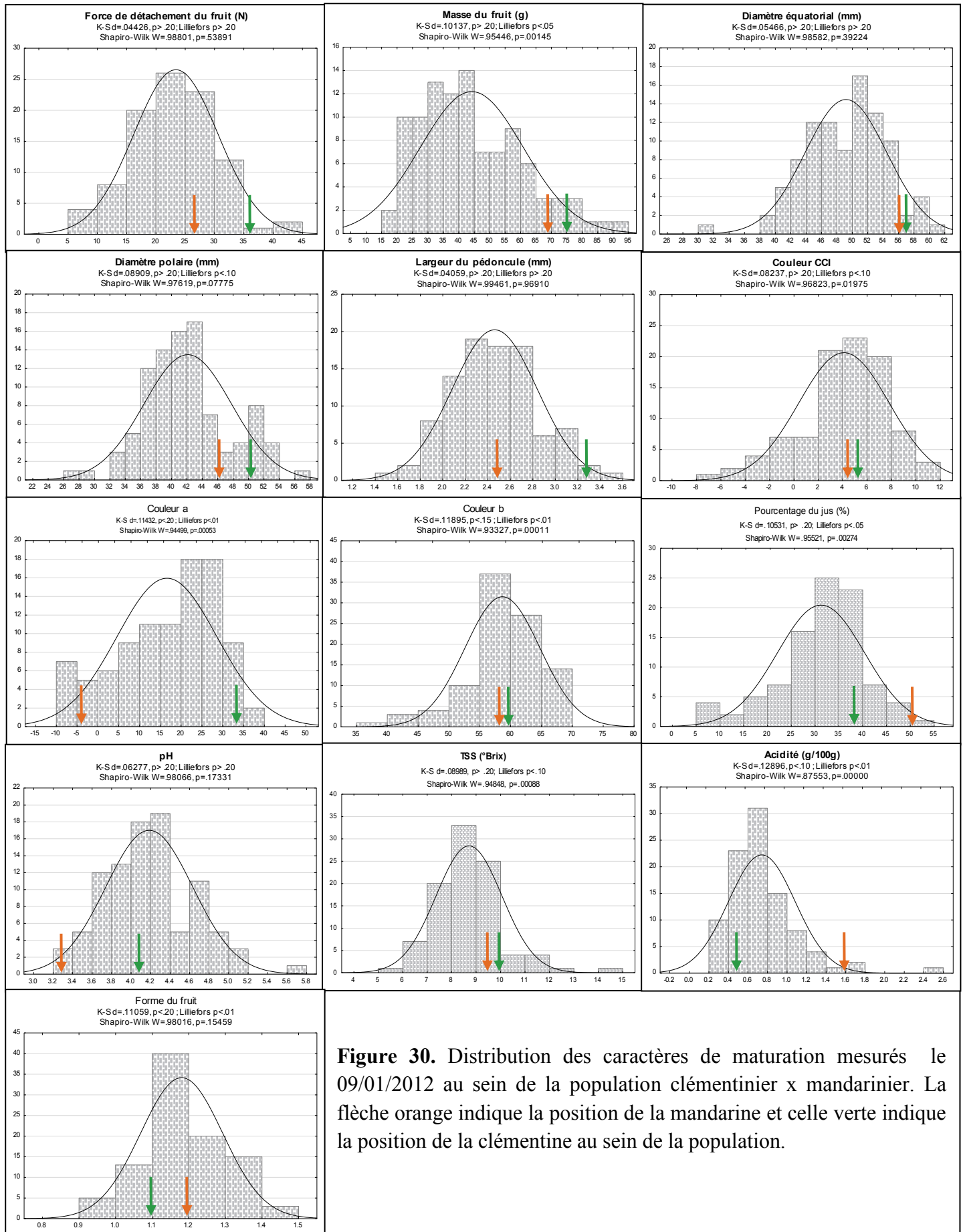
Pour tous les caractères mesurés, la population présente toujours une gamme de valeurs très large c'est-à-dire, intermédiaires, supérieures et inférieures à celles des valeurs parentales (Figure 30). En effet, des phénotypes avec des valeurs plus élevées et/ou plus faibles que les valeurs des deux parents comme pour la TSS, la masse du fruit et le pH ont été observées tout au long de la période de mesures. Cette variation des phénotypes découlerait de l'hétérozygotie des deux parents et de nombreuses combinaisons alléliques nouvelles qui sont créées aux locus concernés, étendant ainsi la gamme de la variation phénotypique au sein de la population. Ce type de distribution des valeurs des caractères suggèrent que leur hérédité est quantitative et probablement polygénique. Bien que les moyennes de certains caractères de la population fluctuent au cours du temps, le type de distribution de la plupart des caractères est quasiment similaire au cours des quatre dates de maturation. Nous n'avons donc représenté que les histogrammes de distribution d'une seule date de mesure, janvier 2012 (Figure 30).

Tous les caractères mesurés au sein de la population évoluent au cours de la période de mesure (les 4 mois au cours de la maturation) à l'exception de la force de détachement du fruit (FDF) et de la largeur du pédoncule. Ces deux derniers caractères restent constants tout au long de la période de mesure (Figure 31). En revanche, l'index de couleur CCI, la masse

du fruit, les diamètres équatorial et polaire, les indices de couleur  $a^*$  et  $b^*$  et la TSS augmentent jusqu'en janvier et se stabilisent par la suite. Au contraire, l'acidité diminue considérablement au cours de la période de mesure et passe d'une moyenne de 1.4 g de citrate /100 g de jus à 0.7 g/100 g de jus et la variation des valeurs diminue également de 0.8 - 4.6 g/100 g de jus en octobre, à 0.2 - 1.6 g/100 g de jus, en février. Enfin, le pourcentage de jus augmente au début de la période de mesure puis diminue légèrement à partir du janvier. Pour l'indice  $a^*$  et le pH, la variabilité maximale est observée en janvier.

Selon les trois tests de normalité de Shapiro-Wilk, Lilliefors et Kolmogorov-Smirnov ( $\alpha = 0.5\%$ ), la moitié des paramètres mesurés, à savoir le diamètre équatorial, le diamètre polaire, la largeur du pédoncule, la FDF et le pH, suit une loi normale de distribution. Le reste des caractères mesurés s'en écarte. Pour être normalisés, ces caractères ont été transformés par le biais des fonctions mathématiques telles que le logarithme et/ou la racine carrée. La normalité de la distribution des caractères est une condition indispensable pour la détection des QTL par la plupart des tests statistiques.





**Figure 30.** Distribution des caractères de maturation mesurés le 09/01/2012 au sein de la population clémentinier x mandarinier. La flèche orange indique la position de la mandarine et celle verte indique la position de la clémentine au sein de la population.

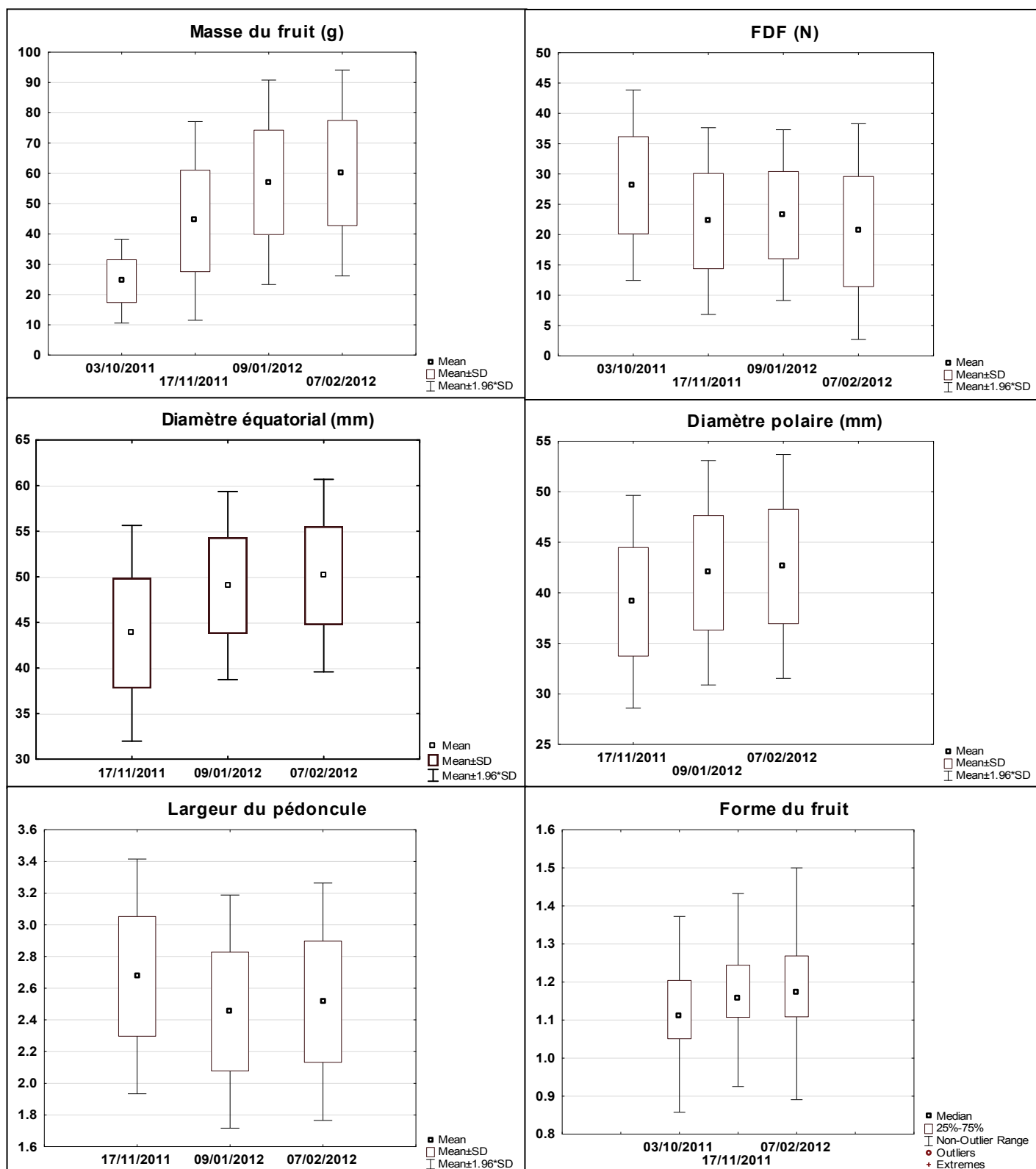


Figure 31. Boite à moustaches de la répartition des valeurs des caractères selon les classes d'effectifs de la population au cours des différentes dates de la maturation des fruits

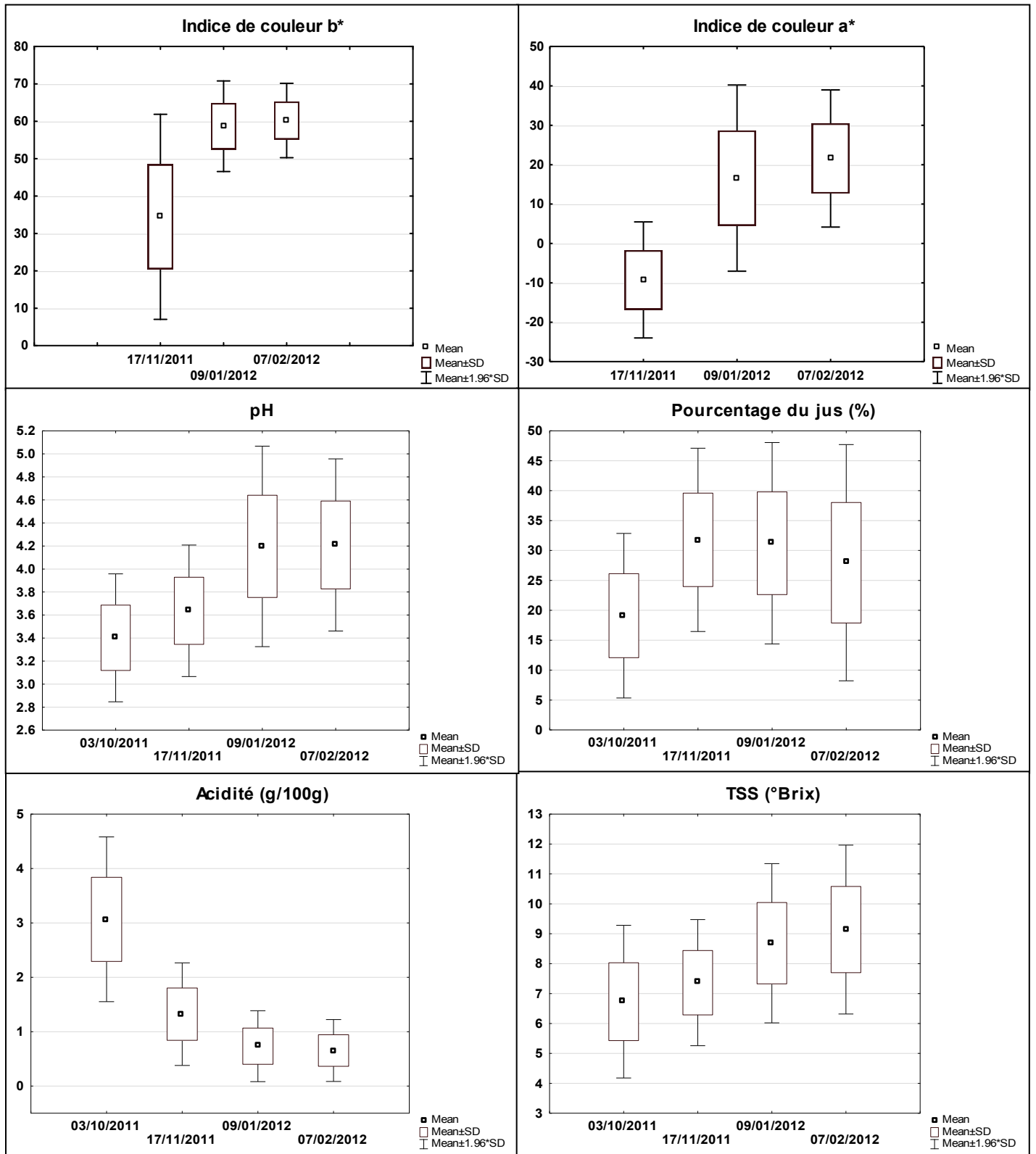


Figure 31 (Suite)

### **2.1.1.2. Corrélations génétiques**

Les coefficients de corrélation de Spearman entre les différents caractères analysés sont présentés dans le tableau 10. Plusieurs caractères semblent être significativement corrélés tout au long de la période de mesures. En l'occurrence, la FDF, la largeur du pédoncule, le diamètre équatorial, le diamètre polaire et la masse du fruit sont significativement corrélés entre eux avec une corrélation plus marquée attendue entre le diamètre et la masse du fruit. Les coefficients de corrélation de ces paramètres varient de 0.23 entre la FDF et la largeur du pédoncule à 0.97 entre le diamètre équatorial et la masse du fruit. Le TSS et le pourcentage de jus sont positivement corrélés. L'indice de couleur  $a^*$  et la TSS présentent des coefficients de corrélation significatifs mais néanmoins faibles. Le pH et l'acidité sont significativement et négativement corrélés. Leurs coefficients de corrélation varient de -0.50 en octobre à -0.87 en janvier. Ces deux derniers caractères sont également corrélés à la masse du fruit (-0.48 en novembre). En revanche, certains paramètres tels que la largeur du pédoncule et la forme du fruit ne présentent aucune corrélation tout au long de la période de mesures. Ceci est vrai aussi pour le pourcentage de jus et les indices de couleur. Les coefficients de corrélation ne varient pas seulement en fonction des caractères mais aussi en fonction de la date de maturation. En effet, certains paramètres présentent des corrélations qui persistent au cours de la période telles que les paramètres cités auparavant. Pour d'autres paramètres les corrélations ne durent cependant pas tout au long de la période de mesures. En effet, la TSS et la masse sont significativement corrélés avec un coefficient de corrélation de l'ordre de 0.6 pour les mois d'octobre et de novembre mais pas corrélés au mois de février. Ceci est observé également pour le CCI d'une part et la TSS et l'acidité d'autre part qui étaient modérément corrélés en novembre (respectivement 0.54 et -0.44) et quasiment plus en janvier.

**Tableau 10.** Corrélations génétiques entre les différents paramètres mesurés au sein de la population à quatre dates au cours de la maturation.

Les lignes 1, 2, 3 et 4 correspondent respectivement à la date 1 : 10/2011, date 2 : 11/2011, date 3 : 01/2012 et la date 4 : 02/2012.

	FDF (N)	Masse (g)	Diamètre équatorial (mm)	Diamètre polaire (mm)	% du jus	Largeur du pédoncule (mm)	pH	Acidité (g/100g)	TSS (°Brix)	CCI	Forme du fruit	Indice de couleur a*	Indice de couleur b*
FDF (N)	1,00												
Poids (g)	0,16 0,50 0,49 0,41	1,00											
Diamètre équatorial (mm)	0,54 0,44 0,41	0,97 0,94 0,95	1,00										
Diamètre polaire (mm)	0,33 0,46 0,42	0,89 0,84 0,83	0,78 0,68 0,70	1,00									
% du jus	-0,07 0,27 0,15 -0,03	0,52 0,51	0,48 0,05	0,37 0,01	1,00								
Largeur du pédoncule (mm)	0,23 0,50 0,40	0,33 0,63 0,49	0,31 0,60 0,48	0,44 0,62 0,49	-0,05 -0,02 -0,17	1,00							
pH	-0,06 0,31 0,13 0,06	0,59 0,53 0,27 0,25	0,55 0,28 0,31	0,38 0,27 0,21	0,67 0,11 -0,25 -0,26	0,05 0,17 0,18	1,00						
Acidité (g/100g)	-0,06 -0,24 -0,16 -0,03	0,02 -0,48 -0,29 -0,27	-0,51 -0,31 -0,33	-0,32 -0,27 -0,22	0,11 -0,18 0,26 0,31	0,04 -0,16 -0,13	-0,27 -0,85 -0,87 -0,86	1,00					
TSS (°Brix)	-0,06 0,24 0,15 -0,06	0,59 0,63 0,21 0,00	0,65 0,42	0,55 0,13 0,50 0,33	0,67 -0,06 0,16 -0,11	1,00 0,34 -0,18 -0,32	0,27 -0,35 0,18 0,36		1,00				
CCI	0,19 -0,06 -0,15	0,25 -0,14 -0,10	0,35 -0,06 -0,05	-0,04 -0,25 -0,19	0,18 -0,04 -0,03	-0,29 -0,15 -0,31	0,50 0,18 -0,07	-0,44 -0,23 0,02	0,54 0,26 0,18	1,00			
Forme du fruit	0,33 0,14 -0,08	0,12 -0,11 -0,03	0,32 0,2 0,3	-0,36 -0,57 -0,53	0,18 0,10 0,22	-0,18 -0,19 -0,11	0,28 -0,04 0,08	-0,26 0,09 -0,07	0,33 0,11 0,18	0,49 0,26 0,13	1,00		
Indice de couleur a*	0,07 -0,02 -0,15	0,13 -0,07 0,03	0,25 0,00 0,06	-0,16 -0,18 -0,07	0,06 -0,09 -0,06	-0,20 -0,16 -0,23	0,38 0,23 -0,01	-0,35 -0,27 0,00	0,43 0,30 0,21	0,54 0,97 0,92	1,00		
Indice de couleur b*	0,18 0,14 0,14	0,30 0,23 0,27	0,38 0,23 0,24	0,07 0,15 0,30	0,13 0,06 -0,05	-0,18 -0,02 0,08	0,52 0,09 0,02	-0,44 -0,10 -0,02	0,44 0,18 0,01	0,92 0,46 0,30	0,43 0,05 -0,13	0,50 0,49 0,22	1,00

### 2.1.1.3. Héritabilité des caractères

Le tableau 11 relate l'héritabilité au sens large calculée pour tous les caractères étudiés. D'une manière générale, on peut considérer que l'héritabilité des caractères mesurés dans notre population est relativement importante. En effet, l'héritabilité moyenne calculée pour tous les caractères au cours de la période de mesures est égale à 0.68. En outre, la valeur d'héritabilité la plus faible est égale à 0.3 et correspond à celle de la FDF. Son héritabilité varie de 0.3 à 0.45 au cours de la période. A l'exception de la FDF, les autres paramètres possèdent une héritabilité supérieure à 0.5. On remarque également que l'héritabilité varie en fonction des dates de mesures. En effet, les valeurs d'héritabilité les plus élevées sont en générale enregistrées à partir de novembre et augmentent au cours du temps. Les caractères les plus hértables ( $H^2 > 0.8$ ) sont le pH en janvier et en février et l'indice de couleur  $a^*$  en novembre et en janvier. L'acidité, le diamètre polaire et la forme du fruit ont une  $H^2 > 0.7$  tout au long de la période de mesures.

**Tableau 11.** Héritabilité des caractères mesurés au cours de la maturation (octobre à février) au sein de la population clémentinier × mandarinier

Caractère	Date de prélèvement	Héritabilité
FDF (N)	10/2011	0.30
	11/2011	0.30
	01/2012	0.34
	02/2012	0.45
	02/2013	0.54
Masse du fruit (g)	10/2011	0.58
	11/2011	0.75
	01/2012	0.69
	02/2012	0.75
Diamètre équatorial (mm)	10/2011	-
	11/2011	0.74
	01/2012	0.63
	02/2012	0.73
Diamètre polaire (mm)	10/2011	-
	11/2011	0.75
	01/2012	0.75
	02/2012	0.78
Forme du fruit	10/2011	-
	11/2011	0.78
	01/2012	0.72
	02/2012	0.72
Pourcentage du jus (%)	10/2011	0.53
	11/2011	0.64
	01/2012	0.69
	02/2012	0.78
Largeur du pédoncule (mm)	10/2011	-
	11/2011	0.55
	01/2012	0.65
	02/2012	0.63
pH	10/2011	0.59
	11/2011	0.86
	01/2012	0.88
	02/2012	0.8
Acidité (g/100g)	10/2011	0.73

	11/2011	0.76
	01/2012	0.77
	02/2012	0.74
TSS (°Brix)	10/2011	0.59
	11/2011	0.67
	01/2012	0.67
	02/2012	0.68
CCI	10/2011	-
	11/2011	0.85
	01/2012	0.75
	02/2012	0.82
Indice de couleur a*	10/2011	-
	11/2011	0.68
	01/2012	0.68
	02/2012	0.82
Indice de couleur b*	10/2011	-
	11/2011	0.88
	01/2012	0.88
	02/2012	0.71

### 2.1.2. Cartes génétiques

Les cartes génétiques établies dans le deuxième chapitre possèdent des régions très denses en marqueurs moléculaires. Il est à noter que la présence de plusieurs marqueurs très proches les uns des autres ralentit les analyses statistiques et peut conduire à des blocages de l'analyse. Dans la plupart des études, les conditions optimales décrites pour estimer l'effet et la position du QTL correspondent à des intervalles de 10 à 15 cM (Lynch et Walsh, 1998). Ainsi pour faciliter les analyses des QTL sans perdre trop d'information génétique, nous avons fait le choix de réduire les régions de forte densité de marqueurs en ne gardant qu'un seul marqueur par locus et les locus distants de plus de 1 cM.

La suppression des marqueurs adjacents positionnés à moins de 1 cM d'un autre marqueur a permis d'établir une carte consensus finale contenant 310 marqueurs alors que la carte du clémentinier et du mandarinier contiennent respectivement 277 et 147 marqueurs (Tableau 12). La majorité des marqueurs sont des marqueurs SNP. La distance moyenne entre deux marqueurs adjacents varie de 1.3 à 3.9 cM sur la carte consensus. En ce qui concerne les deux cartes parentales, l'intervalle moyen varie de 2.2 à 5.3 cM sur la carte du clémentinier et de 3.5 à 6.8 cM sur la carte du mandarinier. Les intervalles maximum sont tous inférieurs à 20 cM pour tous les groupes de liaison sauf pour le groupe 7. Ceci est vrai pour les trois cartes parentales.

**Tableau 12.** Caractérisation des trois cartes génétiques utilisées pour la détection des QTL

	GL1	GL2	GL3	GL4	GL5	GL6	GL7	GL8	GL9
<b>Carte consensus</b>									
Nombre total de marqueurs	37	45	55	39	36	16	20	23	39
Nombre de SSR	8	6	4	6	5	1	3	8	10
Nombre de SNP	31	39	51	33	31	15	7	15	29
Intervalle moyen (cM)	2.8	2.9	2.2	1.3	2.2	3.4	3.9	2.9	2.3
Intervalle maximal (cM)	8.9	10.5	10.0	6.9	10.5	16.4	23.3	12.8	10.7
Intervalle minimal en (cM)	0.1	0.0	0.0	0.0	78.4	0.0	0.0	0.1	0.0
Longueur du GL (cM)	102.0	126.7	92.1/23.9	96.0	78.4	51.6	73.9	65.1	87.8
<b>Carte du clémentinier</b>									
Nombre total de marqueurs	36	24	59	41	26	16	17	22	36
Nombre de SSR	6	6	10	6	4	1	1	6	8
Nombre de SNP	30	18	49	35	22	15	16	16	28
Intervalle moyen (cM)	2.5	5.3	2.4	2.3	3.3	3.4	3.8	4.6	2.2
Intervalle maximal (cM)	9.7	13.3	9.2	8	13.1	16.4	26.3	19.7	9.8
Intervalle minimal (cM)	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Longueur du GL (cM)	85.6	122.6	106.2/32.9	93.8	83.4	51.6	61.9	98.3	79.5
<b>Carte du mandarinier</b>									
Nombre total de marqueurs	9	22	16	22	10	19	7	20	21
Nombre de SSR	8	18	13	18	6	15	6	13	15
Nombre de SNP	1	4	3	4	4	4	1	7	6
Intervalle moyen (cM)	4.2	5.0	5.0	4.3	6.2	3.5	6.8	4.0	3.5
Intervalle maximal (cM)	8.2	18.1	12.6	8.5	10.0	12.9	24.3	16.4	11.3
Intervalle minimal (cM)	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	0.0	0.0	0.1	0.0
Longueur du GL (cM)	33.8	95.8	81.8	91.0	40.1/9.5	63.0	40.8	53.1/10.9	31.7/35.0

### 2.1.3. Identification des QTL

Les QTL identifiés par MapQTL sont présentés dans le tableau 13 et les figures 32, 33 et 34. L'analyse par IM et par MQM a permis de détecter 25 QTL pour les 12 caractères mesurés à différentes dates au cours de la maturation sur la carte consensus. 14 QTL additionnels ont été identifiés sur les deux cartes parentales à raison de 6 QTL sur la carte du mandarinier et 8 QTL sur la carte du clémentinier. Au total, 39 QTL ont été cartographiés. Ces QTL se répartissent sur 7 groupes de liaison, avec seulement les groupes de liaison 4 et 9 sans QTL. Le GL8 possède le nombre le plus élevé de QTL avec 10 QTL au niveau de la carte consensus et 11 QTL au niveau de la carte du clémentinier. Enfin les groupes 5 et 4 contiennent respectivement 5 et 4 QTL sur la carte consensus et les groupes 7 et 5 contiennent 6 et 4 QTL sur la carte du clémentinier.



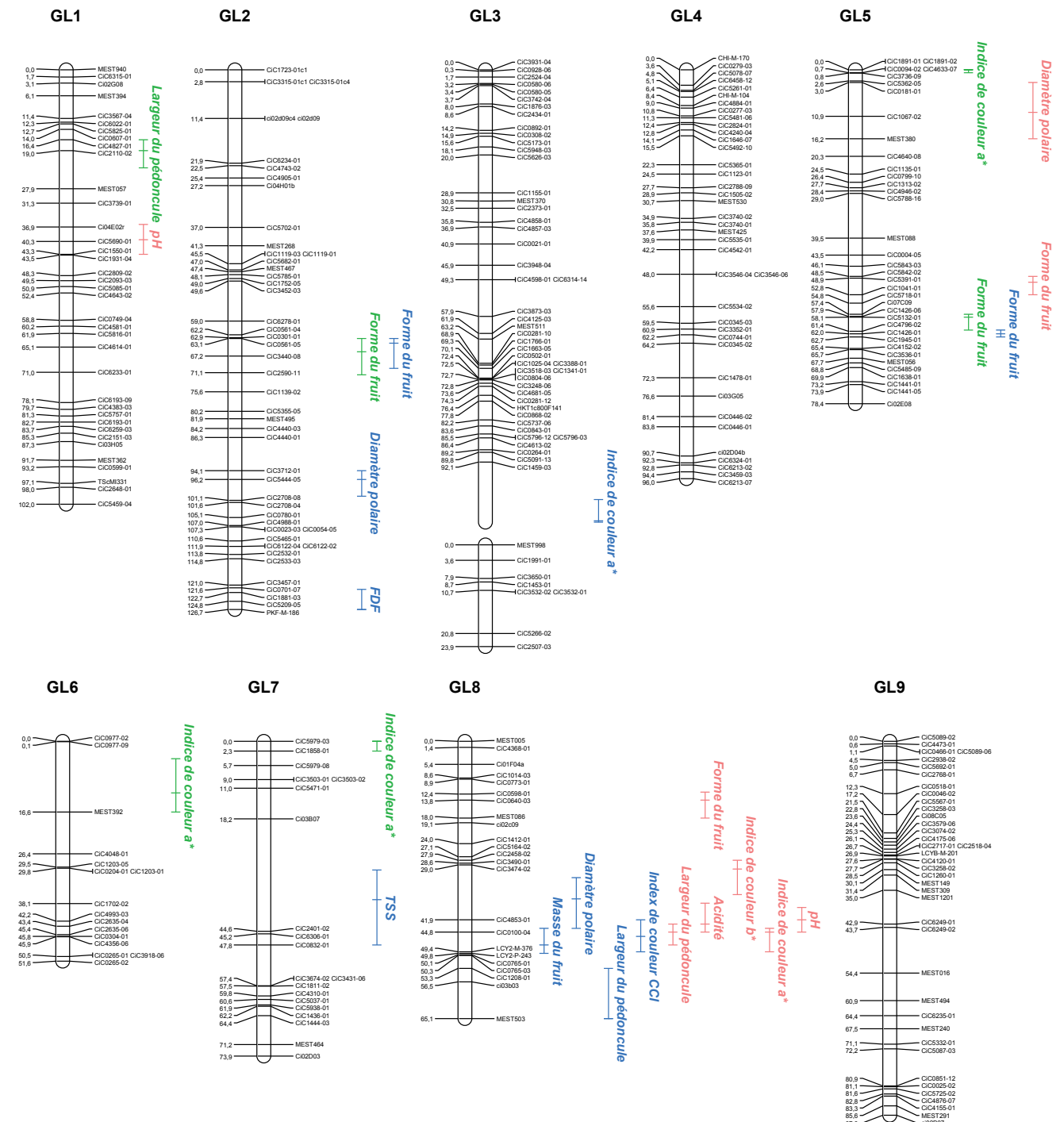
**Tableau 13.** Caractérisation des QTL détectés pour les caractères mesurés au cours de la maturation en 2011/2012 sur la carte consensus et les cartes parentales (C : clémentinier ; M : mandarinier)

Caractères	DP	GL	LOD score maximal	Marqueur le plus proche	Position sur la carte	Intervalle de confiance (cM)	R <sup>2</sup> (%)	QTL additionnels	
Largeur du pédoncule (mm)	Date2	1	4.8	CiC2110-02	18.9	16.4- 22.9	22.1		
	Date3	8	4.4	MEST503	65.0	53.2-65.0	21.7		
	Date4	8	5.3	CiC0100-04	44.7	42.8-47.7	25.0		
Indice de couleur a*		7	7.6	CiC5979-03	0.0	0.0-2.3	30.1		
		5	5.0	CiC1891-02	0.0	0.0-0.6	14.1		
		Date2	6	4.5	MEST392	12.1	4.1-16.5	12.9	
		3	6.3	CiC6243-01	69.5	68.6-70.2	27.1	C	
		1	5.6	MEST362	85.5	83.6-85.5	24.6	C	
		Date3	3	5.1	CiC0748-02	105.9	100.9-106.1	19.6	
		Date3	8	4.4	CiC0100-04	54.7	50.4-59.3	21.7	C
			8	4.6	LCY2-M-376	44.7	43.8-49.4	22.5	
	Date4	7	8.2	CiC1436-01	59.7	59.3-61.8	24.9	C	
		8	4.2	CiC3474-02	30.0	27.8-36.0	20.9		
Indice de couleur b*	Date4	7	7.0	CiC1444-03	59.7	59.3-61.8	21.7	C	
		8	4.8	CiC0100-04	45.7	41.8-49.4	23.3		
Index de couleur CCI	Date3	3	6.3	MEST470	46.5	41.1-49.5	25.4	M	
		7	4.2	MEST380	12.8	4.0-21.8	16.5	M	
	Date4	8	4.3	CiC1208-01	45.5	33.5-46.9	21.3	C	
Forme du fruit		5	5.4	CiC5132-01	58.0	57.4-61.0	18.6		
		Date2	2	5.1	CiC3440-08	60.5	55.0-63.5	17.4	
		10	5.8	CiC1436-01	59.7	59.3-61.8	25.6	C	
		Date3	2	5.2	CiC0561-05	62.5	56.5-63.5	19.0	
			5	4.9	CiC1426-01	62.0	61.0-62.6	18.4	
			7	5.9	CiC1444-03	61.7	59.3-61.8	27.9	C
		Date4	6	4.4	CiC3448-07	49.6	43.6-52.6	21.8	M
			5	9.5	CiC5391-01	49.9	48.5-52.8	34.8	
8			4.3	CiC0640-03	13.7	11.8-17.9	13.8		
Diamètre polaire (mm)	Date3	2	6.0	CiC5444-05	30.5	26.6-32.5	17.4		
		8	5.8	CiC4853-01	37.0	32.0-43.8	16.5		
	Date4	5	4.7	CiC1067-02	9.9	2.9-16.1	22.6		
Diamètre équatorial	Date3	8	4.9	LCY2-P-243	50.4	50.0-50.07	19.9	C	
TSS (°Brix)	Date3	7	5.2	CiC2401-02	37.2	30.2-47.8	24.9		
Acidité (g/100g)	Date4	8	5.0	CiC4853-01	42.8	38.0-44.7	24.5		
FDF (N)	Date3	2	4.5	PKF-M-186	119.3	118.9-122.3	21.9		
pH	Date4	8	8.1	CiC4853-01	41.8	39.0-44.7	32.4		
		1	4.3	CiC5690-01	39.9	36.3-43.2	15.6		
Masse du fruit (g)	Date3	8	4.3	LCY2-M-376	47.7	43.8-49.8	21.4		
Pourcentage du jus	Date2	6	4.1	CiC1596-01	53.6	49.6-53.7	19.1	M	

DP : date de prélèvement/Date 2 : novembre/Date 3 : décembre, Date 4 : février

Les autres groupes contiennent chacun de 1 à 2 QTL. Il est à noter qu'aucun QTL n'a été détecté pour les 6 caractères mesurés en octobre, à savoir la masse du fruit, la FDF, le pourcentage du jus, la TSS, l'acidité, le pH. En revanche le nombre de QTL détectés en novembre, janvier février est égal respectivement à 10, 17 et 12. Ainsi, on peut noter que le nombre le plus élevé de QTL identifiés correspond au mois de janvier, le mois où la mandarine atteint sa maturité commerciale. Le nombre de QTL ne varie pas seulement en

fonction de la date de maturation mais aussi en fonction des caractères mesurés. Ce nombre varie de 0 à 5 QTL par caractère et par date de maturation. Tous les QTL détectés représentent une part relativement importante de la variance totale. En effet, la plus faible valeur de  $R^2$  est égale à 12.9%. En outre, la plupart des QTL expliquent plus de 20% de la variance totale. Cependant, 3 QTL seulement ont un effet majeur avec un  $R^2 > 30\%$ , ceux de l'indice de couleur  $a^*$  mesurée au mois de novembre, du pH et de la forme du fruit mesurés en février.



**Figure 32.** QTL détectés sur la carte consensus pour les paramètres mesurés aux différentes dates de maturation en 2011/2012. Pour chaque QTL nous avons représenté l'intervalle de confiance et la position la plus probable du QTL. Les QTL détectés en novembre, janvier et février sont représentés en vert, bleu et orange respectivement.

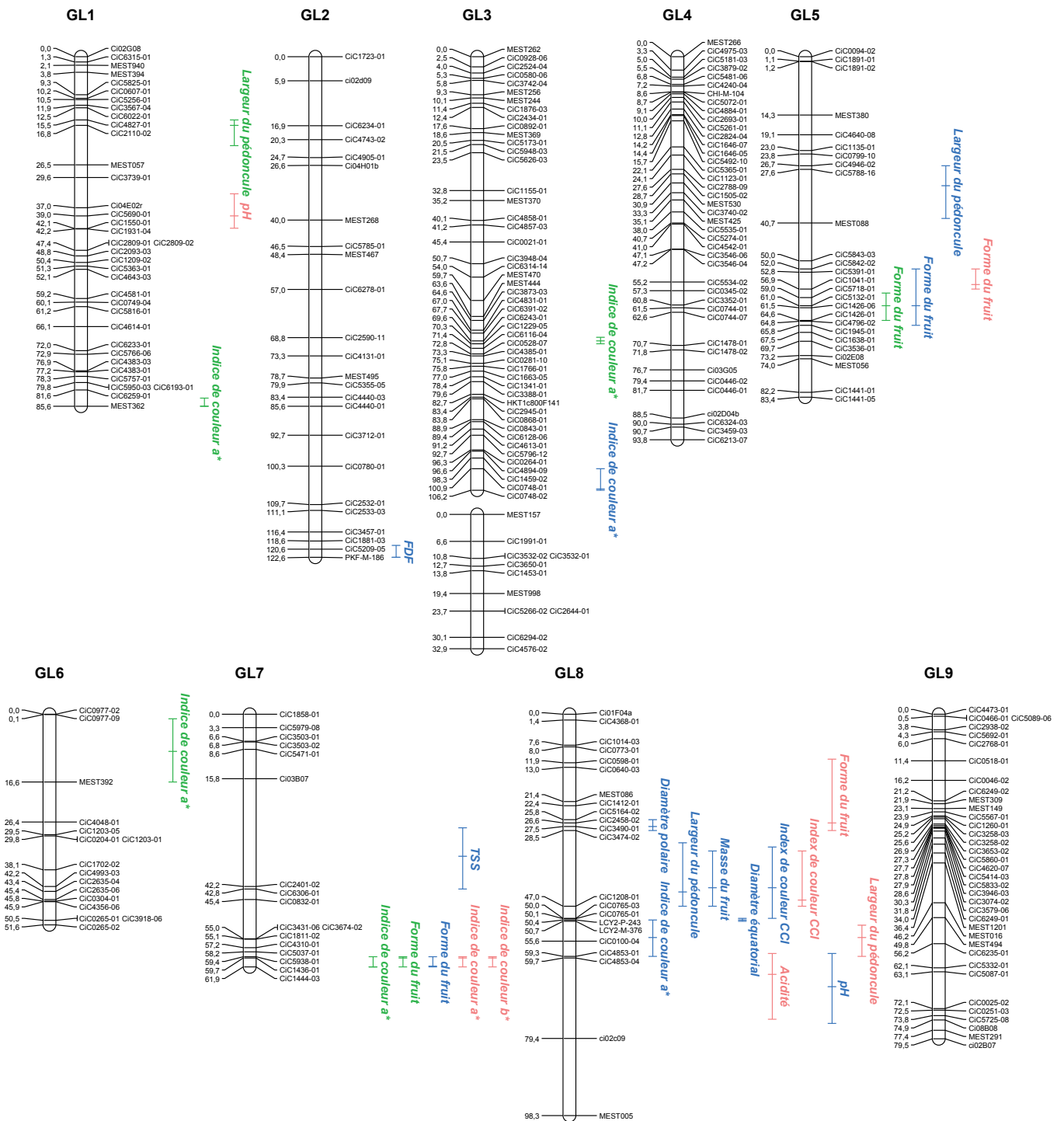
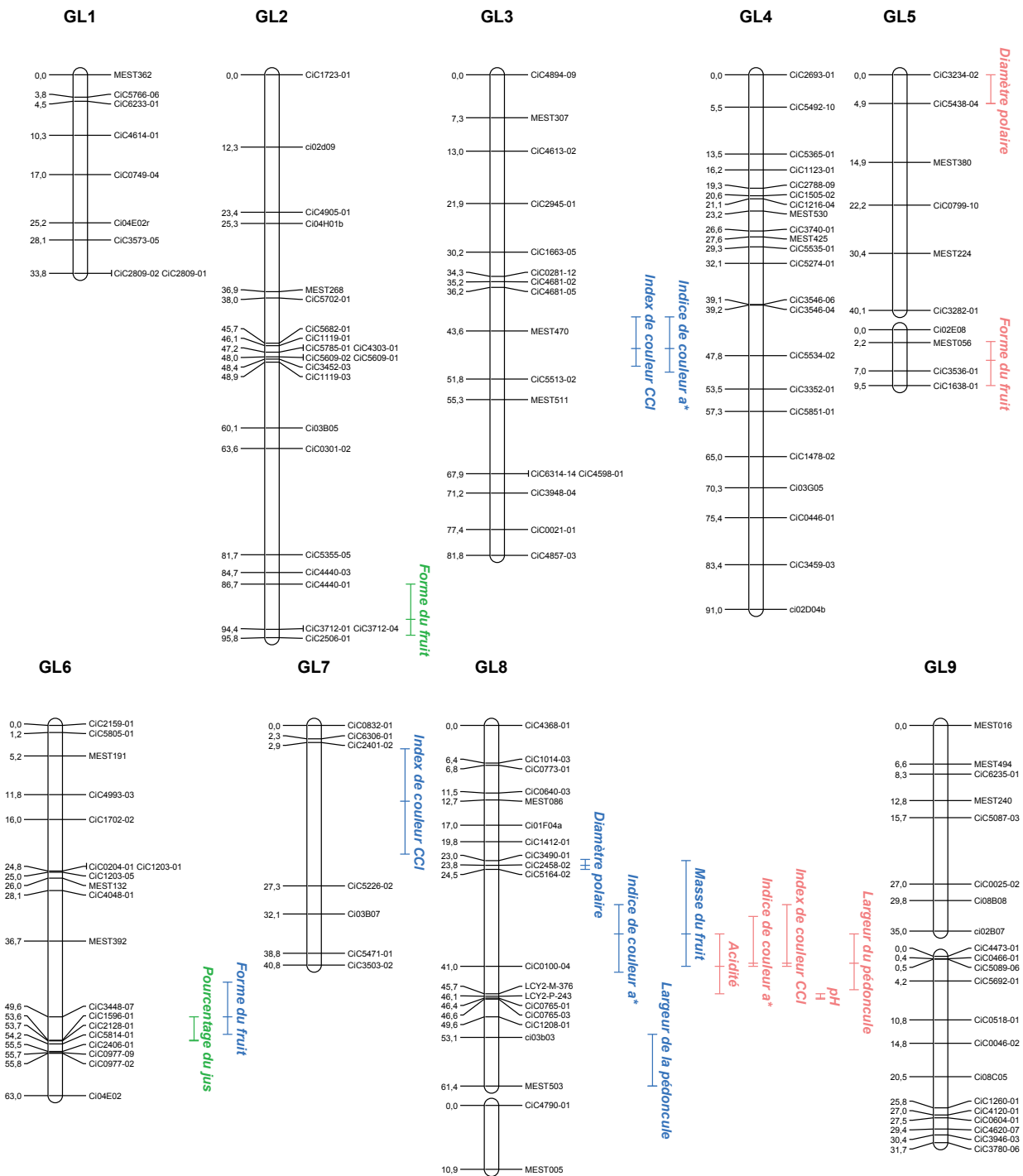


Figure 33. QTL détectés sur la carte du clémentinier pour les paramètres mesurés aux différentes dates de maturation en 2011/2012. Pour chaque QTL nous avons représenté l'intervalle de confiance et la position la plus probable du QTL. Les QTL détectés en novembre, janvier et février sont représentés en vert, bleu et orange respectivement.



**Figure 34.** QTL détectés sur la carte du mandarinier pour les paramètres mesurés aux différentes dates de maturation en 2011/2012. Pour chaque QTL nous avons représenté l'intervalle de confiance et la position la plus probable du QTL. Les QTLs détectés en novembre, janvier et février sont représentés en vert, bleu et orange respectivement.

### **2.1.3.1. Les QTL identifiés pour chaque caractère**

Concernant la largeur du pédoncule, nous avons identifié 3 QTL avec 1 QTL par date de mesure. Celui détecté en novembre est situé sur le GL1 alors que les deux autres ont été détectés en janvier et en février et sont situés dans la partie inférieure du GL8, séparés par environ 5 cM. Les pourcentages de variance expliquée par ces trois QTL sont estimés respectivement à 22, 21 et 25% (Tableau 13).

En ce qui concerne la force de détachement du fruit, un seul QTL a pu être identifié au cours de la période de maturation sur la carte consensus (Figure 32) et sur celle du clémentinier (Figure 33). Ce QTL se situe sur la partie inférieure du GL2. Il explique 21.9% de la variance totale en janvier (Tableau 13).

Les QTL contrôlant le CCI et les indices  $a^*$  et  $b^*$  sont au nombre de 4, 9 et 2 respectivement. L'indice de couleur  $a^*$  est associée ainsi au nombre le plus élevé de QTL dont 4 QTL additionnels localisés sur la carte du clémentinier. En effet, 5 QTL contrôlant la variation de ce caractère en novembre ont été détectés. Les 5 QTL sont situés sur 5 GL différents. Cependant, 4 QTL seulement ont pu être identifiés en janvier et en février à raison de 2 QTL par date de maturation. Au cours de la maturation, 6 GL sont impliqués dans le contrôle de ce caractère à savoir les GL 1, 3, 5, 6, 7 et 8. Le GL 3 contient 2 QTL contrôlant l'indice de couleur  $a^*$ , un en novembre et un deuxième en janvier. En revanche, le GL7 contient deux QTL détectés à deux dates de maturité différentes (novembre et février) mais localisés au niveau de la même région. Sur le GL 8, un même QTL, a été détecté, en janvier et en février. Sur les autres GL, chaque QTL n'est détecté qu'à une seule date. Parmi les 9 QTL contrôlant l'indice de couleur  $a^*$  pendant la maturation, 6 ont un  $R^2 > 20\%$ . Il s'agit de QTL à effet fort dont le maximum est de  $R^2 = 30.1\%$  (Tableau 13). Parmi les trois QTL de l'indice de couleur  $a^*$  mesurée en novembre, 1 est cartographié sur les trois cartes génétiques et 2 sont cartographiés sur la carte du mandarinier (Figures 32, 33 et 34).

En ce qui concerne l'indice de couleur  $b^*$ , les deux QTL identifiés contrôlent 21 % et 21.7% de la variation totale identifiée en février. Le premier a été localisé au niveau du GL 7 de la carte du clémentinier et le deuxième est situé au niveau du GL 8 à la fois sur la carte du clémentinier et la carte consensus (Tableau 13). On remarque que les deux QTL de  $a^*$  et  $b^*$  co-localisent sur le GL 7 mais pas sur le GL 8.

Pour l'index de couleur CCI, trois QTL ont été détectés en janvier et un QTL pour le mois de février. Sur le GL 8 un QTL de l'index de couleur CCI est détecté en janvier et en février et si positionne dans la continuité de celui de l'indice de couleur  $a^*$  sur la carte du

clémentinier (Figure 33). Il explique à lui seul 21.3% de la variance totale. Enfin, sur le groupe 3 de la carte du mandarinier, le QTL de CCI détecté en janvier co-localise avec celui de l'indice de couleur  $a^*$  (Tableau 13).

Parmi les 39 QTL détectés pour les paramètres étudiés au cours de la période de mesure, 9 QTL contrôlent la forme du fruit. Ces QTL sont répartis sur 6 GL (2, 5, 6, 7, 8 et 10). Leur variance totale varie de 13.8 à 34.8%. Parmi eux, en novembre, 3 GL sont impliqués dans le contrôle de la forme du fruit. En janvier, 4 QTL ont été identifiés sur les GL 2 et 5 dont 2 communs à ceux détectés en novembre. L'un des deux a un effet majeur ( $R^2=34.8\%$ ). Contrairement à la forme du fruit pour lequel le nombre de QTL était très important, un seul QTL du diamètre équatorial a été détecté tout au long de la période de mesures, exprimant une variance totale de 22.6%. Quant au diamètre polaire, deux QTL ont été identifiés en février. L'un d'eux est situé sur le GL 2 à 20 cm du QTL de la forme du fruit. Le deuxième QTL a été localisé sur le GL 8. Il chevauche avec le QTL de la masse du fruit. Ce dernier explique 21.4% de la variance totale (Tableau 13).

Deux QTL ont été identifiés pour le pH à une seule date (février). Les deux QTL sont situés sur les GL1 et 8. On remarque que le QTL du GL8 possède un effet majeur ( $R^2>30\%$ ). Ce QTL se situe au même endroit que le QTL d'acidité mesuré en février. Comme c'est le cas de l'acidité, un seul QTL a été détecté pour la TSS, mais pas en février mais en janvier. Il a été identifié au niveau du GL 7. Les deux QTL d'acidité et de TSS expliquent à peu près le même pourcentage de variance totale avec un  $R^2$  égale à 24.5 et 24.9% respectivement.

De même que pour l'acidité et la TSS, un seul QTL a été cartographié pour le pourcentage du jus. Il se situe sur le groupe 6 de la carte du mandarinier et il explique 19.1% de la variance totale (Tableau 13).

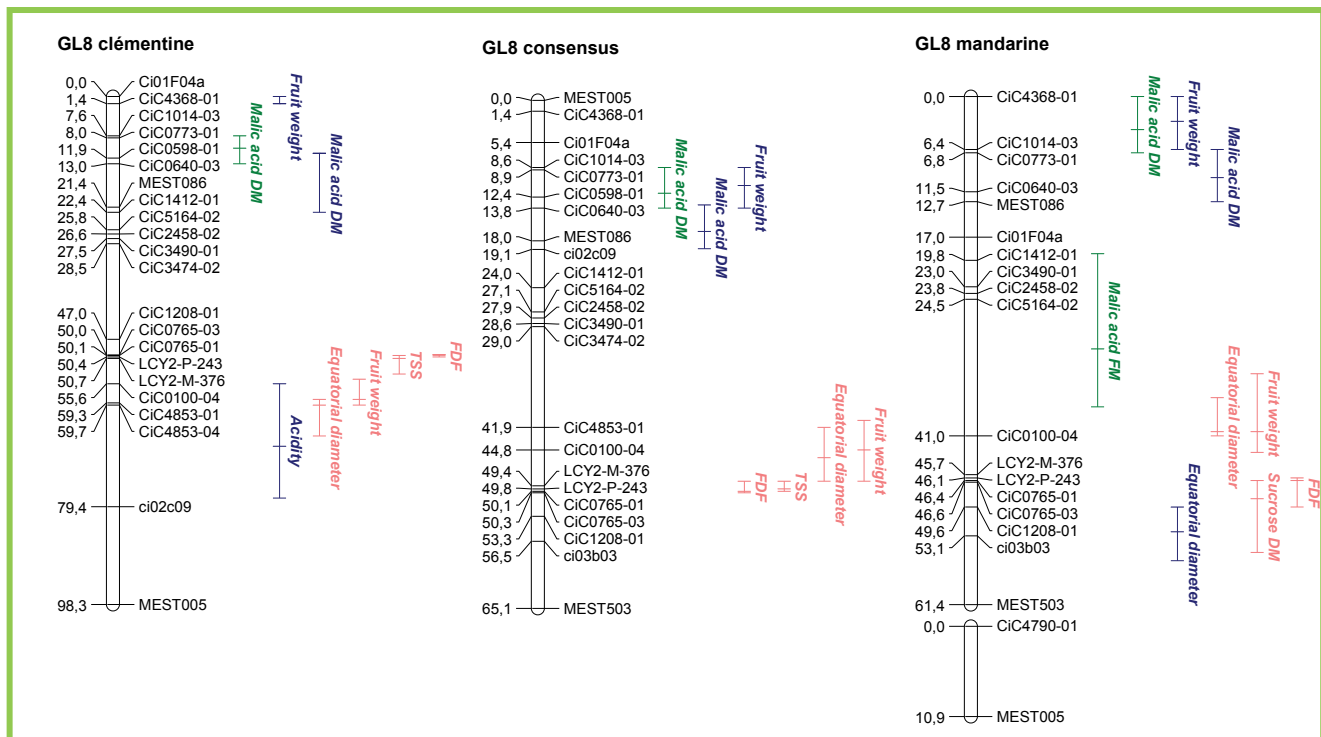
#### ***2.1.3.2. Co-localisations des QTL : pour le même caractère et entre caractères***

Plusieurs QTL de caractères différents co-localisent. Sur la carte consensus dans le GL8, les QTL d'acidité et de pH co-localisent avec un QTL de l'indice de couleur  $a^*$  (Figure 32). Cependant, sur la carte du clémentinier, plusieurs autres co-localisations existent: les QTL de l'indice de couleur  $a^*$  et de la forme du fruit, ceux des indices  $a^*$  et  $b^*$  et ceux de la masse du fruit et de la largeur du pédoncule (Figure 33). Sur la carte génétique du mandarinier, les QTL de la forme du fruit et celui du pourcentage du jus se positionnent au même endroit sur le GL6 (Figure 34). Sur le GL8, la position des quatre QTL des caractères mesurés en février, l'acidité, l'indice de couleur  $a^*$ , le CCI et la largeur du pédoncule, est chevauchante. Une autre co-localisation est observée entre un QTL de l'indice de couleur  $a^*$

et celui du CCI sur le GL3. Il est intéressant de noter que la co-localisation n'a pas été observée seulement entre des QTL contrôlant des caractères différents mais aussi entre des QTL impliqués dans le contrôle d'un même caractère mesuré à différentes dates de maturation. En effet, sur certains groupes de liaison les mêmes régions chromosomiques sont impliquées dans le contrôle de la forme du fruit et du CCI au cours de la période de mesures.

#### **2.1.4. Stabilité interannuelle des QTL**

Le phénotype de la population clémentinier × mandarinier a été étudié sur deux saisons de fructification successives : 2011/2012 et 2012/2013. Le jeu de données de la première campagne a été exploité dans ce chapitre tandis que les données de la deuxième campagne ont été exploitées dans le manuscrit soumis pour publication. Dans la mesure où ces études présentaient plusieurs paramètres en commun à savoir la masse du fruit, le diamètre équatorial, le pourcentage de jus, la TSS, le pH et l'acidité, nous avons pu étudier la stabilité interannuelle des QTL. Les résultats de la campagne 2012/2013 montrent que pour la force de détachement du fruit et ceci pour les trois dates de prélèvement au cours de la maturation, un seul QTL à effet moyen a été détecté en décembre 2012 ( $R^2 = 18.8\%$ ). Ce QTL a été localisé sur le GL8 (Figure 35). En revanche, en 2011/2012, un seul QTL a été localisé sur le GL 2 de la carte consensus et celle du clémentinier (Figure 32 et 33).



**Figure 35.** QTL détectés sur le GL8 des 3 cartes génétiques lors de la fructification de 2012/2013. Pour chaque QTL nous avons représenté l'intervalle de confiance et la position la plus probable du QTL. Les QTL détectés en octobre, décembre et février sont respectivement représentés en vert, bleu et rose.

Pour les mêmes caractères mesurés au cours des deux saisons, uniquement 7 QTL ont été identifiés en 2011/2012 contre 22 QTL identifiés en 2012/2013.

Parmi ces QTL, seulement 4 QTL sont communs aux deux campagnes. Il s'agit des QTL contrôlant l'acidité, la masse du fruit et le diamètre équatorial pour décembre 2011 et février 2012. Les 3 premiers QTL sont situés sur le GL8 (Figure 35). Pour les caractères communs entre les deux campagnes l'héritabilité est plus importante en 2012/2013 qu'en 2011/2012 sur toute la période de mesures (Tableau 14). Prenons comme exemple le pourcentage du jus, l'héritabilité de ce paramètre varie de 0.53 à 0.78 en 2011/2012 et de 0.75 à 0.82 en 2012/2013.



**Tableau 14.** Comparaison de l'héritabilité des caractères mesurée au cours des deux campagnes de fructification de 2011/2012 et de 2012/2013

Caractère	Campagne 2011/2012		Campagne 2012/2013	
	Dates de prélèvement	Héritabilité (H <sup>2</sup> )	Dates de prélèvement	Héritabilité (H <sup>2</sup> )
Masse du fruit (g)	10/2011	0.58	10/2012	0.81
	11/2011	0.75	12/2012	0.81
	01/2012	0.69	-	-
	02/2012	0.75	02/2013	0.80
Diamètre équatorial (mm)	10/2011	-	10/2012	0.79
	11/2011	0.74	12/2012	0.80
	01/2012	0.63	-	-
	02/2012	0.73	02/2013	0.73
Pourcentage du jus (%)	10/2011	0.53	10/2012	0.82
	11/2011	0.64	12/2012	0.75
	01/2012	0.69	-	-
	02/2012	0.78	02/2013	0.80
pH	10/2011	0.59	10/2012	0.67
	11/2011	0.86	12/2012	0.94
	01/2012	0.88	-	-
	02/2012	0.80	02/2013	0.89
Acidité (g/100g)	10/2011	0.73	10/2012	0.81
	11/2011	0.76	12/2012	0.65
	01/2012	0.77	-	-
	02/2012	0.74	02/2013	0.75
TSS (°Brix)	10/2011	0.59	10/2012	0.82
	11/2011	0.67	12/2012	0.71
	01/2012	0.67	-	-
	02/2012	0.68	02/2013	0.61
FDF (N)	10/2011	0.30	10/2012	-
	11/2011	0.30	12/2012	-
	01/2012	0.34	-	-
	02/2012	0.45	02/2013	0.54

Une analyse de variance a été réalisée pour comparer les résultats des deux campagnes (Tableau 15). L'analyse statistique montre qu'il y a un effet en fonction de l'année étudiée. En effet, les valeurs d'un même caractère mesurées deux années de suite sont statistiquement différentes sauf pour l'acidité en octobre.

**Tableau 15.** Statistiques des différences observées entre les deux campagnes de 2011/2012 et de 2012/2013 pour les principaux paramètres

Effet d'année	FDF (N)	Masse du fruit (g)	Diamètre équatorial (mm)	TSS (°Brix)	Acidité (g/100g)	pH	Pourcentage du jus (%)
10/2011-10/2012	-	< 2.2e-16 ***	-	< 2.2e-16 ***	0.09477	< 2.2e-16 ***	< 2.2e-16 ***
11/2011-12/2012	-	< 2.2e-16 ***	< 2.2e-16 ***	< 2.2e-16 ***	< 2.2e-16 ***	< 2.2e-16 ***	< 2.2e-16 ***
02/2012-02/2013	< 2.2e-16 ***	1.123e-09 ***	6.309e-07 ***	< 2.2e-16 ***	< 2.2e-16 ***	< 2.2e-16 ***	< 2.2e-16 ***

Cette analyse a été complétée par une comparaison des données climatiques à savoir la température moyenne, le degré jour, l'humidité relative et la radiation solaire globale mesurés depuis l'anthèse jusqu'à la fin de la période de mesures pendant la maturation au cours des deux campagnes de fructification 2011/2012 et en 2012/2013 (Annexe 3). Des différences ont été notées entre les valeurs notamment pour la température moyenne et l'humidité relative. Des températures plus élevées en juillet et août 2012 et une humidité relative plus élevée en septembre et octobre 2012 que les mois respectifs de 2011. En revanche la radiation solaire globale est légèrement plus forte en 2011 par rapport à 2012. Ces valeurs suggèrent que les conditions climatiques n'ont pas été strictement identiques pour les deux campagnes de mesures.

## 2.2. Discussion

### 2.2.1. Analyse des QTL

#### 2.2.1.1. QTL de la FDF

Le QTL de la FDF détecté en 2011/2012 n'a pas été localisé sur le même chromosome que le QTL identifié en 2012/2013. Ce dernier co-localise avec le QTL de la TSS sur la carte consensus et celle du clémentinier et avec le saccharose (% matière sèche) sur la carte du mandarinier. Ce résultat suggérerait l'existence d'un lien génétique entre la teneur en sucres d'une part, et la FDF d'autre part. Néanmoins aucune corrélation n'a été détectée entre ces deux caractères au cours des 4 dates de mesures (à l'exception de la deuxième date de mesures, en novembre, où la corrélation est cependant très faible (0.24). Par ailleurs, la masse du fruit est modérément corrélée (0.6) à la teneur en sucre dans le sens où les fruits les plus « lourds » donc les plus gros tendraient vers des teneurs en sucres solubles plus élevées sur les deux premières dates (octobre et novembre). De même sur novembre et janvier la masse du fruit est partiellement corrélée à la FDF (0.5) c'est-à-dire que les fruits les plus gros, ou les

plus lourds, tendraient à être les plus fortement attachés au pédoncule. De telles co-localisations pourraient indiquer la présence d'un seul QTL à effet pléiotrope ou de deux QTL étroitement liés. Une analyse plus approfondie serait nécessaire pour pouvoir trancher entre les deux hypothèses. Il est intéressant de noter que la position la plus probable du QTL de la FDF, détecté en 2011/2012, correspond à la position du marqueur PKF-M-186. Le PKF est l'abréviation de phosphofructokinase, une enzyme intervenant dans le métabolisme des sucres au cours de la glycolyse. Le marqueur PKF-M-186 est un marqueur SNP créé à partir de la séquence du gène codant pour cette enzyme (Garcia-Lor *et al.*, 2013). Dans la mesure où le marqueur PKF-M-186 représente à la fois la position la plus probable du QTL de la FDF et le gène codant pour une enzyme impliquée dans la voie de synthèse des sucres, il est probable que ces caractères puissent être contrôlés par le même groupe des gènes. Cette hypothèse est renforcée par la co-localisation entre les QTL de la FDF et de la TSS détectés au cours de la campagne 2012/2013.

#### **2.2.1.2. Les QTL de la couleur du fruit**

Certains QTL des indices de couleur a\* et b\* détectés en février sur la carte du clémentinier et ceux du CCI et de l'indice a\* détectés en janvier et en février sur la carte du mandarinier, co-localisent. Ceci suggère qu'il y a un lien entre les QTL des trois paramètres ou bien que certains QTL contrôlant une partie de la variation totale sont communs aux trois paramètres. Etant donné que le CCI est calculé à partir des 3 indices de couleur L, a et b selon l'équation  $CCI = (1\ 000 \times a) / (L \times b)$  (Jiménez-Cuesta *et al.*, 1982) et dans notre cas avec L\*, a\* et b\*, il est donc logique de trouver des corrélations élevées de 0.97 (janvier) et 0.95 (février) entre CCI et a\* de même que des QTL communs. Par ailleurs, les QTL qui contrôlent l'indice a\* en novembre sont différents des QTL détectés en janvier, bien qu'ils soient tous situés sur le même groupe de liaison (GL3). Au cours de la maturation des fruits la coloration de la peau résulte de deux réactions physiologiques : la synthèse de caroténoïdes et la dégradation de la chlorophylle (Tadeo *et al.*, 2008). La chlorophylle et les caroténoïdes ont les mêmes précurseurs dans la voie de biosynthèse. Sous l'induction de la baisse des températures et /ou de la luminosité, la chlorophylle est dégradée, sa synthèse est stoppée et la voie de synthèse est orientée vers celle des caroténoïdes xanthophylles apportant une coloration orange (Iglesias *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2004). Ce virage de couleur (« color break » en anglais) pour la clémentine et autres agrumes apparentés au mandarinier, s'initie en Corse, environ vers le mois de novembre. Il est donc tout à fait logique que dans notre étude le CCI soit plus corrélé avec l'indice b\* ce mois-là qu'avec a\*, puisque b\* varie beaucoup à cette date. L'indice b\*

renseigne du passage de vert au jaune (dégradation de la chlorophylle). Les mois suivants c'est l'inverse, car la chlorophylle est entièrement dégradée chez tous les hybrides de la population, laissant apparaître la variation de couleur dans la gamme de l'orange qui est représentée par l'indice  $a^*$ . Les deux indices de la chromaticité  $a^*$  et  $b^*$  sont des mesures indirectes de la concentration des pigments présents dans le flavédo du fruit. Selon Meléndez-Martínez *et al.* (2007), il existe une forte corrélation entre les valeurs de  $a^*$  et de  $b^*$  et les concentrations en caroténoïdes tels que le lycopène, la canthaxanthine... Ces composés sont très diversifiés chez les agrumes et leurs concentrations ainsi que leur type varient énormément selon les espèces (Tadeo *et al.*, 2008). Le flavédo de la mandarine Willow leaf contient à peu près 56% de violaxanthins et 20% de cryptoxanthins (Matsumoto *et al.*, 2007) tandis que celui de la clémentine contient entre 5 à 32% de  $\beta$ -citraurin (coloration rouge), 15 à 50% de violaxanthin et 17% de  $\beta$ -cryptoxanthin (Ríos *et al.*, 2010). D'après Sugiyama *et al.* (2011), 13 QTL de la teneur en violaxanthin et 3 QTL pour celle de la cryptoxanthin localisés sur 14 groupes de liaison ont été identifiés à partir de l'analyse de ségrégation dans une descendance issue de plusieurs croisements de différentes espèces d'agrumes. Ces résultats pourraient donc expliquer le nombre élevé de QTL associés au caractère couleur de la peau, détectés dans notre étude.

#### **2.2.1.3. QTL de la forme du fruit, du diamètre équatorial et du diamètre polaire**

Concernant la forme du fruit, plusieurs QTL localisés sur 6 groupes de liaison ont été identifiés aux mois de novembre, janvier et février avec une même position à chaque date sauf pour le groupe 5 de la carte consensus. Sur ce groupe de liaison, les QTL des mois de novembre, janvier et février se situent à proximité les uns des autres. Ceci laisse supposer que le contrôle génétique de la forme du fruit ne change pas au cours de la maturation car ce paramètre est contrôlé par le même groupe de gènes quel que soit la date de maturation. Chez la tomate un QTL majeur *fs8.1* de la forme du fruit a été mis en évidence, six jours avant anthèse (Ku *et al.*, 2000). Dans notre étude, les QTL de la forme du fruit ne co-localisent pas avec ceux du diamètre équatorial et du diamètre polaire malgré la significativité de leurs coefficients de corrélation génétique. Ces résultats ne sont pas en accord avec les résultats de Chang *et al.* (2014) qui montrent une forte corrélation entre la forme de la pomme et le diamètre équatorial et le diamètre polaire traduite par une co-localisation de leur QTL sur la carte génétique. Il est à noter que les QTL de ces deux caractères mesurés au cours de la campagne 2012/2013 co-localisent. On peut donc supposer que l'absence de co-localisation entre ces trois caractères n'est pas due à l'absence d'un lien génétique mais plutôt à la non

détection des QTL des diamètres équatorial et polaire. En effet, sur les 3 dates de maturation, seulement trois QTL ont été détectés. Deux QTL du diamètre polaire au mois de janvier expliquant 33.9% de la variance totale et un QTL du diamètre polaire mesuré en février expliquant 22.6% de la variance totale. Au final, ces trois QTL sont loin d'expliquer la variance phénotypique totale de ces deux caractères.

#### **2.2.1.4. QTL de la TSS et de l'acidité**

Deux QTL ont été identifiés pour la TSS et l'acidité. Le QTL de TSS a été détecté au mois de janvier et celui de l'acidité au mois de février. Le QTL de l'acidité correspond à la période où la variation de l'acidité et les valeurs sont les plus faibles au sein de la population. Cette observation ne vaut pas pour la TSS. Bien que ces deux QTL aient un effet important ( $R^2 > 24\%$ ), ils n'expliquent pas la variance totale. Il est très probable que ces deux caractères sont contrôlés par d'autres QTL qui n'ont pas été détectés notamment pendant les mois où ces caractères présentent la plus forte variation. Chez plusieurs autres espèces telles que la tomate (Saliba-Colombani *et al.*, 2001) et le melon (Monforte *et al.*, 2004), la TSS et l'acidité sont souvent contrôlés par plusieurs QTL suggérant la complexité de leur déterminisme génétique.

L'acidité décroît au cours de la phase de maturation (Albertini, 2006). Cette décroissance est variable selon la variété ou l'espèce: elle peut s'initier à partir de valeurs maximales différentes et avoir la même vitesse de décroissance, elle peut aussi être décalée dans le temps, ou alors avoir une vitesse variable. Seulement notre étude ne porte pas sur la cinétique d'accroissement ou de décroissance mais sur la variation au sein de la population à une période donnée. Les seules explications à l'absence de détection de QTL sur toute la période d'observation que nous puissions évoquer sont : un sous-effectif d'hybrides ne permettant pas une distribution normale de la variation du caractère au sein de la population ou un nombre d'échantillons trop restreint à chaque date de mesure donnant ainsi des écarts par rapport à la moyenne trop importants.

#### **2.2.2. Variance phénotypique expliquée par les QTL**

Les QTL des caractères détectés au cours de la période de mesure possèdent un effet important. En effet, la plupart des QTL expliquent plus de 20 % de la variance. Il est à noter aussi qu'aucun QTL à effet faible n'a été identifié. On peut donc supposer que le reste de la variance totale des caractères étudiés est expliquée par des QTL à effets faibles ou modérés qui n'ont pas pu être détectés. Ces derniers résultats seraient très certainement dus à l'effectif insuffisant de la population. En fait, bien que la population étudiée ne soit pas si petite (116 individus) comparativement à d'autres études de QTL, l'effectif n'est pas suffisant pour

pouvoir détecter des QTL à effet très faible ou modéré. En effet, un très grand nombre d'études montrent que l'augmentation de la taille de la population a des effets sur la puissance de détection des QTL. Plus la taille de la population est grande, plus le nombre de QTL détectés et la précision de leur localisation augmente (Vales *et al.*, 2005).

### **2.2.3. Co-localisations des QTL**

Il est clair que les larges intervalles de confiance et la présence de plusieurs QTL dans un même groupe de liaison peut donner lieu parfois à des co-localisations par chance. Ainsi, une analyse précise des co-localisations nécessite un retour aux données biologiques et aux analyses statistiques faites sur les données phénotypiques initiales. L'association des résultats des corrélations phénotypiques et génétiques avec ceux de la cartographie des QTL permet ainsi d'identifier des corrélations intéressantes mais aussi sûres.

Comme nous l'avons déjà signalé, les QTL de l'acidité et du pH sont localisés au même endroit. En outre, d'après l'analyse des coefficients de corrélations, ces deux paramètres sont fortement corrélés surtout aux mois de novembre, janvier et février. Cette co-localisation paraît évidente et ne peut pas être due au hasard dans la mesure où ces deux paramètres sont liés du point de vue biologique. En effet, l'accumulation et le transport des acides sont fonction du pH de la vacuole et du cytosol (Etienne *et al.*, 2013). Une telle liaison traduite par une co-localisation a été identifiée dans plusieurs études sur plusieurs espèces autres que les agrumes connues par leur teneur importante en acides comme par exemple le pêcher (Eduardo *et al.*, 2011). Il est très probable qu'il s'agisse d'un QTL à effet pléiotrope au vu de la relation causale qui existe entre l'acidité et le pH.

Les QTL d'acidité et de pH se chevauchent avec celui de la largeur du pédoncule. Par ailleurs aucune corrélation significative n'a été détectée au cours de la maturation entre ces deux paramètres chimiques et la largeur du pédoncule.

L'absence de QTL communs et de corrélation entre l'acidité et la TSS suggèrent l'indépendance du contrôle génétique de ces deux caractères, bien que liés biochimiquement (Etienne *et al.*, 2013). Les deux caractères peuvent donc être améliorés indépendamment. Cette relation d'indépendance a été mise en évidence également chez la tomate (Causse *et al.*, 2001).

La co-localisation du QTL contrôlant la largeur du pédoncule avec celui de la masse du fruit, les deux mesurés en novembre, confirment les corrélations génétiques. En effet, ces deux paramètres sont significativement corrélés tout au long de la maturation. En revanche, selon le coefficient de corrélation de Spearman, il apparaît que ces deux caractères sont davantage corrélés au mois de novembre, d'où la co-localisation de leur QTL détectés à cette

date de maturation. Plusieurs études ont démontré la corrélation positive qui existe entre ces deux paramètres chez les agrumes (El-Otmani *et al.*, 1993 ; Bustan *et al.*, 1995). Le taux de croissance du fruit et ainsi son poids et sa taille sont reliés directement à la formation de xylème et de phloème au niveau du pédoncule (Garcias-Luis *et al.*, 2002). Ce lien physiologique explique la co-localisation des QTL contrôlant la largeur du pédoncule et le poids du fruit. Cette co-localisation a été observée également chez le piment. En effet, une corrélation entre la masse du fruit et la largeur du pédoncule (valeur proche de 0.6) s'est traduite par une co-localisation de leur QTL sur 3 groupes de liaison (Chaim *et al.*, 2001).

Une co-localisation concernant les QTL de l'indice de couleur  $a^*$  et de la masse du fruit a pu être mise en évidence sur la carte du mandarinier et la carte consensus. C'est également le cas pour le CCI et la masse du fruit sur la carte du mandarinier. Les mêmes résultats ont été mis en évidence chez le piment (Chaim *et al.*, 2001) et la tomate (Saliba-Colombani *et al.*, 2001). En effet, au cours de ces deux études, il a été démontré que la couleur et la masse du fruit sont corrélés d'où la co-localisation de leur QTL. Cependant dans notre étude, quelle que soit la date, ces deux caractères ne sont pas corrélés. Il est donc possible que les QTL sont différents même s'ils se localisent dans une région proche.

#### **2.2.4. Stabilité des QTL**

La stratégie de détection des QTL au cours de deux ou plusieurs années ou dans des environnements différents permet de vérifier la stabilité des QTL détectés et de les classer en fonction de leur stabilité (Sewell et Neale, 2000). En effet, l'identification des QTL stables permet d'identifier les régions génomiques qui contribuent, dans plusieurs conditions environnementales à la variance totale du caractère. Quelques QTL contrôlant la masse du fruit, l'acidité et le diamètre équatorial ont été détectés au cours des deux campagnes de fructification successives et sur les mêmes groupes de liaison. Ce sont les seuls QTL stables identifiés au cours de cette étude. En revanche cette stabilité ne caractérise pas la majorité des QTL détectés. Le nombre de QTL détectés en 2012/2013 est de loin supérieur au nombre de QTL détectés au cours de la fructification de 2011/2012. Ceci est probablement dû à la différence de l'héritabilité des caractères étudiés au cours de deux campagnes. En effet, l'héritabilité des caractères mesurés en 2012/2013 est plus forte que leur héritabilité en 2011/2012. Il a été démontré à plusieurs reprises que plus l'héritabilité est élevée plus la puissance de détection des QTL augmente (Charmet, 2000). En outre, la maturation est un processus qui dépend énormément des conditions environnementales y compris les conditions climatiques (Iglesias *et al.*, 2007). Dans notre étude, on suppose que la variation

environnementale observée sur les données climatiques entre les deux années soit à l'origine de la variation de détection des QTL. Cela est très courant et rend compte de l'influence de l'environnement sur les caractères quantitatifs (Samouelian et Gaudin, 2009) et du climat sur la maturation du fruit (Ladanyia, 2008).

### **3. Manuscrit sur la détection des QTL de la qualité des fruits**

#### **Mapping of QTL for citrus fruit quality traits along maturation on clementine and mandarin genetic maps**

Hajer Khefifi<sup>1,2</sup>, Doriane Bancel<sup>3</sup>, Agnès Doligez<sup>4</sup>, Gilles Costantino<sup>2</sup>, Brito AC<sup>1,5</sup>, Dominique Brunel, Ollitrault Patrick<sup>1</sup>, Morillon Raphael<sup>1</sup> and Luro, François<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CIRAD, UMR AGAP, Avenue Agropolis - TA A-75/02 – 34398 Montpellier cedex 5, France

<sup>2</sup>INRA, UMR AGAP Corse, F-20230 San Giuliano, France

<sup>3</sup>INRA UR-PSH Plantes et Systèmes de culture Horticoles 84914 Avignon Cédex 9 France

<sup>4</sup>INRA, UMR AGAP, F-34060 Montpellier, France

<sup>5</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Soane Nazaré, Km 16, Rodovia Jorge Amado, 45662-900, Ilhéus- Bahia, Brazil

<sup>6</sup>INRA, UR EPGV, 2 rue Gaston Cremieux, 91057 Evry, France

\*Corresponding author: [luro@corse.inra.fr](mailto:luro@corse.inra.fr)

Number of tables: 6; Number of figures: 4, Number of supplementary figures: 2, Number of supplementary tables: 1

Article en préparation pour soumission à TGG

#### **Abstract**

Citrus fruit quality is defined as the combination of physical and chemical traits, some of them changing during the ripening phase such as acidity and sugar content. The understanding of their genetic control would be very helpful for breeding programs because the longevity of juvenile phase and some reproductive features limit the production of hybrid populations. In this context, a genetic study was performed on the heredity of quality traits and the detection of QTLs, based on segregation in a progeny generated from a cross between clementine *cv* 'Commun' (*Citrus reticulata* × *C. sinensis*) and mandarin *cv* 'Willow leaf' (*C. reticulata* Blanco). Parental and consensus genetic linkage maps were established using 645 SNP and SSR markers. These maps were represented by 10 linkage groups in consensus and



clementine maps representing and 12 linkage groups in mandarin map, representing 74%, 75% and 58% of the reference map, respectively. A total of 16 traits including fruit mass, equatorial diameter, juice percentage, TSS, acidity, pH, glucose, fructose, sucrose, citric and malic acid concentrations were evaluated at three maturation dates. High variation showing transgressive segregation was found for all traits, with normal or close to normal distribution. QTL analysis performed by Multiple QTL Model allowed the detection of 45 QTLs on the three maps. QTLs were distributed in several different linkage groups and detected most of the time at only one date of ripening phase. The percentage of total variation explained ranged from 12% to 37% per QTL. Major QTLs ( $R^2 \geq 30\%$ ) were detected for equatorial diameter, glucose and fructose in percent dry matter. Co-localization of QTLs controlling correlated and uncorrelated traits were mainly found on chromosomes 2, 4, 8 and 9, in particular between fruit mass and acidity.

### **Introduction**

Modern citriculture requires the development of new varieties with higher yield and nutritional quality but also better tolerance to biotic and abiotic constraints to be respectful of the environment (Gmitter Jr et al. 2007). Fruit quality and its evolution during maturation progress are based on external and internal complex traits where juice percentage, acid and sugar contents are major determinants of internal fruit quality (Iglesias et al. 2007). Some of them show continuous variation (Spiegel-Roy and Goldschmidt 1996). During maturation of orange and mandarin-like varieties, fruit acidity, mainly due to citric and malic acids, decreases and fruit sweetness increases (Bain 1958). In addition to the ratio between sugar content and acidity, date is used as an indicator of fruit maturity and thus determines the start of fruit harvest (Iglesias et al. 2007).

A comprehensive understanding of the genetic determinism of fruit quality during maturation is necessary to facilitate the breeding of new varieties (Gmitter Jr et al. 2007). However, conventional citrus breeding programs are facing to many constraints such as juvenility phase which extends generally from 5 to 7 years, large plant size, high heterozygosity of main cultivars, polyembryony which reduces chances of zygotic seedlings and self-incompatibility (Ollitrault and Luro 1997). Thus, marker assisted selection (MAS) is potentially highly advantageous to citrus breeding since it allows selection at the seedling stage and thus overcomes mentioned breeding difficulties related to some of these citrus reproductive constraints (Roose 2007). The development of this approach depends on the

development of molecular markers with known map positions to detect linkage with economically important traits (Staub et al. 1996). Consequently, several citrus genetic maps have been established (Jarrell et al. 1992; Ruiz and Asins 2003; Chen et al. 2008). The majority of these linkage maps were generated mainly from intergeneric crosses and sometimes only with dominant markers which are less informative and reproducible than co-dominant ones. A first reference genetic map in *Citrus* (*C. clementina*) was established by using an interspecific cross between clementine and pummelo and co-dominant markers (SSRs, Indels and SNPs) (Ollitrault et al. 2012a). This kind of cross is not directly useful for genetic studies of QTL for fruit quality traits, but it is a starting point to build genetic maps of genome cultivars and to locate QTL associated to specific traits.

Although QTL mapping of fruit quality has received a surge of interest during the last years in many species such as cucumber (Serquen et al. 1997), melon (Verde et al. 2002), apple (Calenge et al. 2005), peach (Quilot et al. 2005), grapevine (Doligez et al. 2013), tomato (Ashrafi and Foolad 2015), it has been developed to a lesser extent in *Citrus*. The majority of *Citrus* reports dealt with QTLs related to fruit yield (García et al. 2000) or tolerance/resistance to diseases such as *Tristeza* (Asins et al. 2004), *Phytophthora* (Siviero et al. 2006) or salinity (Tozlu et al. 1999). Only a few reports related to fruit quality traits such as acidlessness, carotenoid content and some morphological fruit traits have been published (Fang et al. 1997; Sugiyama et al. 2011, Şahin-Çevik and Moore 2012). Thus, knowledge of the genetic variation control of citrus fruit traits related to fruit maturation is still quite limited.

In order to analyse the genetic determinants of citrus fruit quality during maturation, the phenotypic variation of physical and chemical attributes of fruit were studied in a population derived from a cross between two genetically close cultivars, clementine and mandarin. The objective of this work was to map QTLs associated to citrus fruit quality traits. Genetic maps were built with codominant markers. Fruit attributes such as mass, equatorial diameter, pH, acidity, sugars content, glucose, fructose, sucrose, citric acid and malic acid contents were monitored at different dates during fruit set.

## **Material and Methods**

### **Experimental population**

This study was based on a segregating population derived from a cross between clementine *cv* ‘Commun’ (*Citrus reticulata* x *C. sinensis*) (C) and mandarin *cv* ‘Willow leaf’ (*C. reticulata* Blanco) (M), with clementine as the female parent. The direction of this cross

was chosen because of the gametic self-incompatibility and the absence of apomictic reproduction of clementine, which allowed to regenerate only hybrids coming from cross hybridization. This cross is similar to a backcross because clementine is originated from a cross between mandarin and orange and orange probably came from a cross between two (mandarin x pummelo) hybrids (Ollitrault et al. 2012a; Wu et al. 2014). Due to its pedigree (additional figure 1), clementine is close to mandarin phenotype but heterozygous due to alleles inherited from pummelo (*C. maxima*) (Ollitrault et al. 2012a). This offspring segregated for several different fruit traits such as maturity period and acidity level, fruit color, seedless etc. This progeny consisted of 116 hybrids grafted onto 20-year-old Carrizo citrange (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*) without replicate. The parents of the cross were grown in the same conditions. The orchard was located at the INRA-CIRAD citrus Germplasm repository in Corsica. Standard cultural practices were applied regularly in order to maintain the orchard healthy. Fruit quality traits were evaluated during one maturation period over years 2012 and 2013.

### **Phenotyping**

The CxM progeny trees and the two parents were evaluated during fruit maturation. Because the maturation periods of clementine and mandarin in Corsica correspond respectively to November and January-February (Jacquemonde et al. 2013), fruit measurements were performed at three different periods in October and December 2012 and in February 2013. At each date, 10 randomly selected fruits per genotype were collected around the tree and several quality trait attributes were evaluated: fruit mass, equatorial diameter, juice percentage, pH, titratable acidity (TA expressed in g of citrate/100 g of juice), sugar content (TSS in °Brix), citric and malic acids and soluble sugars (glucose, fructose, sucrose) content expressed in % of dry and fresh matter.

Fruit diameter was measured using a digital caliper (Mitutoya, Absolute digimatic). Fruit juice was extracted with an electric press, filtered and weighted, according to the standardized and normative method for citrus fruit commercialisation (CEE-ONU FFV-14). The pH and titratable acidity were determined using an autotitrator (Mettler Toledo) as described in (Albertini et al. 2006). Sugar content was measured using a digital refractometer (RFM710).

### **Measurement of sugars and organic acids**

Organic acids and soluble sugars were extracted and analyzed by enzymatic assay according to (Gomez et al. 2007), adapted to citrus fruit. Briefly, fruit pulp was lyophilized

using a lyophilizer (Christ BETA 1-8-LD). 2 mL of water were added to 20 mg of lyophilized pulp powder ground using tissue lyser II (QIAGEN). Samples were centrifuged for 5 min (17000 g, 4°C, Sigma 4-16K). 1650 µL of supernatant were recovered and supplemented with 10 mg of polyvinylpyrrolidone (PVP) (part no. 25 249/54/1, Sigma-Aldrich Corp., Lyon, France) to eliminate residual phenols. After homogenization of samples using a vortex and agitation for 20 min at 4°C on a rotating wheel, the Eppendorf tube was centrifuged (10 min, 17000 g, +4°C). Then supernatant was recovered and stored at -80°C prior to analysis.

Soluble sugars and organic acids were quantified using an absorbance microplate reader (Biotek, ELx808) according to (Gomez et al. 2007). Some modifications were done to adapt these procedures to citrus fruit samples. The only difference with the initial protocol of Gomez et al. (2007) was the duration of enzymatic reaction. For glucose and fructose, NADH concentration became stable after three hours instead of two after starting reaction. For the two organic acids, NADH concentration reached the plateau two hours after the beginning of reaction instead of three. During enzymatic reaction, microplate was placed in an oven at 25°C, the optimal temperature for all used reagents.

### **Statistical analysis and BLUPs**

Statistical analysis was performed using Statistica 10 and R softwares. The mean and standard deviation of each trait were estimated for the two parents and their hybrids separately. Distribution normality was evaluated using Shapiro-Wilk test (Royston 1995). As many traits did not follow a normal distribution, phenotypic correlations among traits were calculated using the non-parametric Spearman correlation coefficient. For traits deviating from normality, several transformations (ln, square root and cubic root) were tested. The least-skewed transformed data were used to extract the Best Linear Unbiased Predictors (BLUP) of genetic values for each date (Robinson 1991) using a linear model with a random genotypic effect:  $P_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$ , where  $P_{ij}$  was the transformed phenotypic value of fruit  $j$  of genotype  $i$ ,  $\mu$  the overall mean,  $G_i$  the random effect of genotype  $i$  and  $e_{ij}$  the residual error effect. BLUPs of genotypic values were used for genetic correlation estimation and QTL detection. Variance estimates were used to estimate broad-sense heritability ( $H^2$ ) as:  $\sigma^2_G / (\sigma^2_G + \sigma^2_e)$ .

### **Genotyping of the CxM population**

To genotype the progeny with molecular markers, young leaves were harvested from each genotype. Total DNA was extracted from leaf tissue using the method described by (Doyle 1987). SSR amplification and detection of amplified DNA fragments were performed according to (Luro et al. 2008). The genetic map was constructed using SSR markers

heterozygotes in at least one parent and developed from genomic mandarin DNA library (Ci\*\*\*\*\*) (Froelicher et al. 2008) or clementine EST library (MEST\*\*\*) (Luro et al. 2008). SNP markers (CiC\*\*\*\*-\*\*) were mined from clementine BACend Sequence database (Terol et al. 2008). They were selected among a total of 1536 SNPs used to implement an Illumina GoldenGate assay (Ollitrault et al. 2012a) on their quality and segregation in our population for at least one parent. Aoc\*\*\*\*, CHI-\*-\*\*\*, LCY2-\*-\*\*\*, TScMI1331, HKT1c800F141, PSY-M-289, PKF-M-186 were also SNP markers, mined by Sanger sequencing of 44 genotypes representative of *Citrus* and relatives. These markers were obtained from some genes involved in the primary and secondary metabolite biosynthesis pathway and salt tolerance (Garcia-Lor et al. 2012). Some of these markers have been published in Ollitrault et al. (2012b). The SNPs markers used in our study have been previously mapped on the clementine genetic map which is also the citrus reference genome map (Ollitrault et al. 2012a).

### **Genetic linkage maps**

Genetic linkage analysis and map construction were performed with Join Map 4 (Van Ooijen 2006) and maps were drawn with Mapchart 2.3 (Voorrips 2002). Framework consensus and parental maps were constructed based on 645 markers and 105 CxM hybrids trees, with population type CP. Segregation distortion for parental and consensus data was assessed with  $\chi^2$  tests according to the segregating type of each marker. For subsequent QTL analysis, the number of markers was reduced in very densified mapped regions by maintaining only one marker per locus and removing all others mapped at the same position. Grouping was achieved using a minimum LOD score of 4. Regression mapping algorithm (round 2) and Kosambi mapping function were used to establish map order and distances in centiMorgans (Kosambi 1943; Stam 1993) within each linkage group. Linkage group nomenclature was the same as in the Clementine reference map (Ollitrault et al. 2012a).

### **QTL detection**

The association of markers with phenotypes for each trait was tested by interval mapping (IM) and Multiple QTL Model (MQM; Composite Interval Mapping equivalent) using the software Map QTL version 6 (Van Ooijen 2009). This analysis was performed on the BLUPs of genetic values for each date, on parental and consensus maps. For each trait, we determined the IM LOD threshold through 1000 permutations of traits over marker data, for a genome wide first type error rate of 5%. Thereafter, MQM was performed by selecting as cofactors the markers nearest to the QTLs detected with IM. The manual selection of cofactors increased the number of identified QTLs. It allowed the detection of several QTLs which could not be

detected only by IM. The non-parametric Kruskal-Wallis rank-sum test was also used to check results obtained by MQM, especially for QTLs detected in large intervals between adjacent markers, with a stringent significance level of 0.001. Confidence intervals of QTL positions were determined as one-LOD support intervals. QTL results were drawn using MapChart 2.3 software.

## **Results**

### **Distribution of phenotypic traits**

The distribution of the different traits investigated is presented in Fig. 1. As expected, the majority of the traits such as equatorial diameter, juice percentage, and sucrose content in % DM presented a normal distribution. However some traits such as acidity and pH deviated from normality. Therefore appropriate transformations (ln or square root) (Table 1) were applied to unskew their distribution. The continuous variation indicates that the studied traits are possibly controlled by several genes, and thus, were classified as quantitatively inherited.

Mean, maximum and minimum values and standard deviation of fruit traits in the progeny and in parents for the three dates evaluated along maturation, are presented in Tables 2 and 3. During maturation, mandarin fruits were significantly more acid than clementine ones, which showed lower concentration of citric acid but higher concentration of malic acid (Table 3). Minor differences were observed between the two parents regarding glucose content (% of DM and % of FM). For other traits such as TSS and juice percentage, differences were minor between clementine and mandarin for the first two dates (October and December) but they increased afterwards (Table 2). During maturation in parents, fruit mass and equatorial diameter increased until December and then stabilized in clementine, while these two parameters continuously increased in mandarin. However, juice percentage increased until December and then decreased considerably in the two parents (Table 2).

In the CxM offspring and parents, sucrose was the major sugar during maturation. Its concentration was about three to fivefold higher than glucose and fructose ones, which were equivalent (Table 3). All sugar concentrations increased between October and December and then remained relatively constant.

Among acids, citric acid presented the highest concentration, especially in October where it was about 13-fold higher than malic acid concentration. During maturation, citric acid decreased while malic acid increased, except for mandarin. Despite these evolutions during fruit maturation, citric acid remained the predominant organic acid (Fig.1). During

maturation, the progeny followed an evolution trend similar to the one of clementine (Table 3). Total acidity and citric acid concentration continuously declined from December until February, especially for mandarin. Nevertheless, malic acid did not show the same evolution since its concentration increased until December and then kept constant (Table 3, Fig.1).

A wide variability was observed within the population. Average trait means varied over the three dates. For equatorial diameter, pH and TSS, the range of variation was approximately 1.5 to twofold. For juice percentage, fruit mass and acidity, the range of variation was about 5 to sevenfold (Table 2).

For organic acids and sugars, the range of variation was 3 to fiftyfold. However, variability decreased during maturation for sugars calculated in % of DM, *i.e.* sucrose concentration varied in the population between 5.3 and 33% of DM in October, while it ranged from 26.5 to 52.8% DM in February. Conversely, the range of variation increased for citric acid (% DM) (Table 3).

Phenotypes with much larger and/or lower values than the highest and lowest values estimated for the two parents were observed for juice percentage, fruit mass, equatorial diameter, TSS, glucose, fructose, sucrose. Indeed, the majority of fruit traits segregated in a transgressive manner. For example, fruit mass ranged from 15.7 to 78.5 g in the population, despite the very small difference between parents (39.4-39.1g). Conversely, acidity and citric acid were distributed essentially within the range of parental values (Fig.1).

### **Genetic correlation and heritability**

Correlation coefficients calculated between BLUPs of the genetic value are detailed in Table 4. Several traits appeared to be correlated together. Fruit mass and equatorial diameter, highly correlated with each other, were also correlated to most studied traits measured in October such as juice percentage, glucose and fructose. Fruit mass and equatorial diameter were negatively correlated to acidity and citric acid all along maturation. For all biochemical traits, high correlations were observed between concentrations in DM and FM. Among sugars, the strongest positive correlations all along maturation were observed between glucose and fructose, ranging from 0.50 to 0.98 depending on the date. Sucrose and TSS were positively correlated together all along maturation. Significance of some correlations between traits varied during maturation. For example, sucrose FM and glucose DM were correlated in October but uncorrelated in December and February. Both acidity and pH, which were negatively correlated, presented correlations with citric and malic acids. In October, the two

acids DM were not correlated, while later on in December and February, both acids became negatively correlated. Fructose FM and DM were negatively correlated to citric acid DM. Last, a few weak but significant correlations were observed between malic acid and sugars.

For all traits, broad-sense heritability ( $H^2$ ) values were quite high ( $> 0.5$ ) (Table 1). They varied from 0.64 to 0.82, 0.50 to 0.94 and 0.61 to 0.89 for traits measured in October, December and February, respectively. The average value of heritability for the different studied traits was 0.7 for each date. In October, fruit mass, acidity and TSS showed the highest heritability ( $> 0.8$ ). In December, the highest heritability values ( $> 0.8$ ) were observed for fruit mass, equatorial diameter, pH and malic acid. However, in February, the traits showing heritability higher than 0.8 were fruit mass, juice percentage, pH, citric acid FM and DM, malic acid FM and glucose FM (Table 1).

### **Genetic linkage maps**

A total of 645 SNP and SSR markers were genotyped in clementine x mandarin offspring. Out of these, 622, 618 and 275 markers were selected to construct the consensus, clementine and mandarin maps, respectively. Consensus and citrus reference (clementine) maps shared 551 common SNP markers (Ollitrault et al. 2012a). Thus a comparison between these two maps could be performed. The comparative analysis showed conservation of synteny. Furthermore, the colinearity was highly conserved between the two maps, with very few inversions and distance differences (Additional figure 2). To facilitate QTL analysis, the map density was reduced by removing markers with several missing data and with the same or very close positions ( $< 1\text{cM}$ ), without modifying map coverage. The final number of markers retained for the framework consensus clementine and mandarin maps were respectively 310, 277, and 147. SSR and SNP markers were grouped in ten linkage groups on consensus and clementine maps and on 12 linkage groups in mandarin map. On consensus and clementine maps, the third linkage group consisted of two parts. On mandarin map the number of linkage groups divided into several parts was more important due to the lower number of markers: three linkage groups consisted of two parts each. The consensus, clementine and mandarin maps covered respectively 795.7 cM, 809.8 cM and 629.7 cM, which corresponded to 74%, 75% and 58% of the genome, respectively, when compared to the saturated clementine genome map reference (Ollitrault et al. 2012a). Linkage groups had a mean distance of 2.6, 3.3 and 4.7 cM between adjacent markers on consensus, clementine and mandarin maps, respectively. Some linkage groups had large marker intervals. The linkage groups 6 and 7 had intervals ranging between 16 and 24 cM on the three maps. Additionally,



the linkage group 2 on mandarin map had one interval marker of 18 cM. Another large interval was observed in the extremity of the linkage group 8 in clementine map.

### **QTL identification**

#### **Overview of QTL analysis**

QTL detection was performed using genotypic BLUPs for each date on consensus (C) and both parental (Cl and M) framework maps. LOD score of significant QTLs ranged from 3.6 to 8.3. We retained only QTLs detected by MQM and confirmed by Kruskal-Wallis test.

A total of 29 QTLs were identified in the consensus map, for all traits along maturation except glucose FM and citric acid FM (Table 5), with 1-3 QTLs per trait and date. Nine QTLs were detected in October, 10 in December and 10 in February. QTLs were found on all LGs, except LG6. The individual percentage of explanation of the total variation ( $R^2$ ) ranged from 13.1% to 34.1%. 17 QTLs showed a  $R^2$  between 10% and 20%, 10 QTLs between 20% and 30% and 2 QTLs higher than 30%. Colocalization between QTLs for different traits was observed at several places.

The majority of QTLs detected in consensus map were also detected in clementine map (Additional table 1). Less QTLs were detected in mandarin map than in consensus and clementine maps. 26 additional QTLs were detected in the two parental maps including one on LG6 (Additional table 1)

#### **Fruit mass and equatorial diameter**

For fresh mass, the largest number of QTLs was found in February, on LGs 1 (Cl map), 2 (C and Cl maps), 3 (C and Cl maps) and 8 (bottom part, on the 3 maps) (Fig. 2, 3 and 4). The QTL on LG 2 was also present in October. On the upper part of LG8, an additional QTL for fresh mass was detected in December on the 3 maps. In October, two QTLs were found on LGs 4 and 5, either on the consensus or clementine maps. The percentage of total variance explained by each of these fruit mass QTLs ranged from 13.1 to 22.7.

QTLs for equatorial diameter colocalized with QTLs for fresh mass at the same dates on LGs 2, 4 and 8 (bottom part). An additional QTL for equatorial diameter on LG1 did not colocalize with any fruit mass QTL. Diameter QTLs explained from 13.7 to 25.1% of total variance (Fig. 2, 3 and 4).

### **Juice percentage**

Only one QTL, located on LG9, was associated to juice percentage in December on the consensus and clementine maps, and explained 27.3% of total variation (Fig. 2 and 3). It was colocalized with a QTL detected in February on the mandarin map (Fig. 4).

### **TSS**

On the consensus and clementine maps, one QTL explaining 19.8% of total variation was identified on LG8 in February (Fig. 2 and 3). On the mandarin map, no QTL for TSS was detected whatever the maturation date.

### **pH and acidity**

In October, one QTL for pH, explaining 16.2% of variance, was detected on LG2 in consensus and clementine maps (Fig. 2 and 3). A second QTL accounting for 26.1% of total variance was located on LG7 in December only, in consensus and clementine maps. One QTL was located on LG3 of clementine map and one on LG5 of mandarin map, in December. For acidity, one October QTL colocalized with the pH QTL on LG2 in consensus and clementine maps. A single acidity QTL was found in December on LG8 for clementine only.

### **Sugars**

In February, QTLs associated with glucose, fructose and sucrose expressed in DM were mapped in the same linkage group, LG9, of the consensus and clementine maps. The QTL for fructose overlapped with the QTL for glucose. They were the largest effect QTLs in this study, contributing by more than 30% to total variance (Table 5). Other consensus QTLs were detected for sucrose on LG5 and fructose on LGs 2 and 3 in December, among which only the LG2 QTL was also found in clementine map. In mandarin map, while fructose and glucose February QTLs colocalized on LG 9, QTLs for sucrose were also detected on LG2, LG3, LG6 and LG8 for the same date (Fig. 4). Two QTLs for fructose DM were found on LG2 and LG3 in December, which accounted for 27.3 and 14.8%, respectively. QTLs controlling fructose FM and sucrose FM in December were found on LG9 and LG5 respectively. The variance explained was 17.8 and 17.9%, respectively (Table 5).

### **Organic acids**

One QTL for citric acid DM was identified in October on LG2 of consensus and clementine maps. This QTL overlapped with the unique QTL of acidity and explained 24.1% of total variance. One QTL for citric acid FM was found in February on LG1 of mandarin map. Two QTLs were detected for malic acid DM on the consensus and both parental maps, one in October and the other one in December. These two QTLs overlapped on LG8. For malic acid expressed in FM, two QTLs were located on LG 4 (20.1 %) and LG9 (15.5%) of

consensus and clementine maps in December. A third QTL was mapped on LG1 in February on consensus and mandarin maps.

## **Discussion**

### **Accuracy and power of QTL detection**

To optimize QTL detection especially in the case of two linked QTLs, we used MQM since it increases the power of QTL detection and the precision of QTL position estimation, and allows to map additional QTLs located on the same chromosome (Paterson 1997). 29 QTLs of quality attributes in citrus were found on the consensus map, most of which (25) had a relatively important effect ( $R^2 > 15\%$ ). Both parental and consensus maps were used to yield complementary results. Indeed, QTLs with dominant allelic effects like fructose DM identified on chromosomes 2 and 3 and pH mapped on chromosome 7 in December were detected only on the consensus map. Conversely, detection power could be larger in parental maps for QTLs with additive effects only, as shown by the 16 additional QTLs identified only on parental maps and not on consensus map. In total, 45 QTLs were identified along maturation.

In addition, the use of BLUP values improved the QTL detection power by removing part of the environmental variance. Indeed, several studies demonstrated the effectiveness of this method such as in apple (Segura et al. 2009) or grapevine (Doligez et al. 2013).

### **QTL detection**

In our case, all traits along maturation had high heritability ( $H^2 > 0.56$ ), which increased our chances to detect QTLs. However, in our study, the main power limitation was related to the number of individuals present in the population. In fact, even though the size of population size was not very small (105 individuals), it may be not have been enough to detect QTLs with minor effects (Staub et al. 1996). The only detected QTLs were the ones with large effects that could reach statistical significance (Beavis 1998).

The percentage of variation explained by QTLs detected along maturation varied between 13.1 and 34.1. Fruit mass, equatorial diameter, malic acid FM and fructose DM were controlled by more than one QTL. The presence of several QTLs showed the complexity of metabolic pathways. QTLs of fruit mass detected during maturation did not explain 100% of total variance which suggest the presence of other undetectable QTLs and/or epistatic effects which may explain the remaining percentage of total variation.

To our knowledge, this work is the first report of QTL mapping of fruit attributes in citrus during maturation. Şahin-Çevik and Moore (2012) studied QTLs of morphological traits in citrus including three fruit characteristics: fruit length, width and segment number. Their population was composed of 98 hybrids derived from an intergeneric cross, but fruit characteristics were evaluated from only 48 fruiting plants by measuring five fruit samples for each genotype. The genetic map was constructed using 69 dominant RAPD markers and no QTL of fruit width was identified, probably as a result of small sample size and partial map coverage. In our case, the use of a larger population, a more complete map and a higher number of measurements (replicates) increased chances to identify QTLs for fruit size. Indeed, QTL detection is known to be affected by environmental conditions, which represent an important source of variability (Rousseaux et al. 2005; Kenis et al. 2008).

### **Trait correlations and QTL co-localization**

Several traits were clustered mainly on chromosomes 2, 4, 8 and 9 whatever the evaluated dates. These clusters may reveal a pleiotropic effect of one QTL or a tight linkage between at least two QTLs. A QTL with pleiotropic effect indicates the segregation of a unique QTL controlling several traits due to related metabolisms or causal relationships between traits (De Vienne and Causse 1998). Several QTL clusters for fruit maturation and agronomical traits were detected in previous studies in many species, including tomato (Monforte et al. 1999), peach (Etienne et al. 2002), apple (Liebhard et al. 2003) and citrus (Sugiyama et al. 2011). Common or close locations of QTLs were often observed for correlated attributes (Paterson et al. 1991).

In this study, QTL co-location was observed for the majority of studied fruit traits including fruit mass, equatorial diameter, pH, acidity, sugar and acid contents. QTL clusters varied during maturation. Indeed, some of them were stable along maturation but other ones were identified for only one or two maturation dates. This lack of stability of fruit quality QTLs during maturation suggests that some fruit traits are not governed by the same chromosomes along maturation.

Ting and Attaway (1971) reported that fruit mass and equatorial diameter evolution are interrelated during fruit development and maturation. The strong correlation of these two attributes was corroborated by more than one QTL co-location in different chromosomes at two maturation dates in the consensus map: 2 and 4 in October, 2 and 8 in February. Probability of pleiotropic effect is higher when co-location between the same traits is found in different chromosomes. Thus, the co-location between QTLs of these two traits was probably

not due to fortuitous linkage or to chance (De Vienne and Causse 1998). Instead, it is probable that fruit mass and equatorial diameter were controlled by QTLs with pleiotropic effects. The implication of several regions of different chromosomes in the control of these two traits revealed their complexity as in other species such as apple (Kenis et al. 2008) or tomato (Grandillo et al. 1999).

QTLs of titratable acidity and fruit mass measured in October were mapped at the end of chromosome 2 on the consensus map, and negative correlations were obtained between acidity and fruit mass. The negative correlation between acidity and pH is corroborated by the co-localization of QTLs for these traits on linkage group 2 in the consensus map. The same QTL cluster was found in peach (Dirlewanger et al. 1999) and grape berries (Chen et al. 2015). This correlation is probably due to the causal effect of pH on acidity. Indeed, pH is considered as one of the main determinants of citrate and malate accumulation (Etienne et al. 2013).

In this study, acidity and citric acid shared a common QTL on the consensus map. In addition to their high correlation, this suggests that citric acid contributes markedly to acidity. Indeed, fruit acidity in citrus is primarily determined by the concentration of citric acid considered as the major organic acid (Monselise 1986) with 80-90% of total organic acids (Baldwin 1993). It is interesting to note that while only one QTL was found for citric acid and acidity, malic acid seems to be controlled by a much more complex scheme since 5 QTLs located in different chromosomes during maturation were identified.

The SNP marker PKF-M-186 was the marker with the highest LOD score for fruit mass, diameter and citric acid DM colocalized in LG2. PKF-M-186 marker was obtained from genes involved in primary biosynthesis pathways by Ollitrault et al. (2012b). It is coding for phosphofructokinase, an enzyme involved in sugars and acids pathways (Echeverria and Valich 1989; Etienne et al. 2013). Therefore, this marker comes from a potential candidate gene for citric acid variation.

On chromosome 8, a QTL for TSS was very near but did not overlap a QTL for fruit mass in February, whereas these traits were not significantly correlated. In agreement with our results, (Monforte, 2004) showed the independence of these two traits measured in melon. However, in tomato a clear co-localization between QTLs of fruit mass and TSS was shown, suggesting pleiotropic effects of QTLs (Goldman et al. 1995; Saliba-Colombani et al. 2001).

The very high correlation between fructose and glucose DM ( $r = 0.95$ ) was consistent with a co-localization of QTLs for those traits on chromosome 9 in February. Both QTLs presented major effects ( $R^2 > 30\%$ ). In grape berries, one QTL was detected for these two hexoses, which were highly correlated (Chen et al. 2015). These QTLs can facilitate breeding programs by controlling fruit sweetness. However, while fructose and glucose contribute to total sugars, their QTLs were not co-located with the QTL for TSS, whereas they were expected to be related. In February, both fructose and glucose were negatively correlated to sucrose DM. A QTL for sucrose was found in the same chromosome region as glucose and fructose QTLs. Sucrose is the main form of translocated carbon in Citrus (Garcia-Luis et al. 1991). It is transported from leaves until the juice sac head where it is partitioned into glucose and fructose (Goldschmidt and Koch 1996). The conversion of sucrose to hexoses explains the negative correlation between these three sugars and the co-localization of their QTLs. Four additional QTLs of sucrose DM were identified in mandarin map. These QTLs were mapped in four different chromosomes showing that this trait is influenced by several genes.

Our results showed that QTLs of acidity did not co-localize with sugar QTLs. The same result was obtained for tomato in the study conducted by (Causse et al. 2001). Thus, the different locations of QTLs for sweetness and sourness, which play an important role in fruit taste, flavor and organoleptic quality (Iglesias et al. 2007), revealed the possibility to improve both traits independently.

## **Conclusion**

Fruit quality traits showed large variation in the progeny during maturation. Using the consensus and parental genetic maps, QTLs related to fruit quality traits were localized on several linkage groups. Many of these traits were correlated. Forty five QTLs for the major physical and chemical components of fruit were detected at three different dates of fruit maturation. Malic acid is controlled by several QTLs during maturation, revealing a more complex genetic determinism than citric acid, for which only one QTL was found. Several QTL clusters were identified. The majority of QTLs were mapped in three linkage groups (2, 8 and 9). This suggests that some QTLs may have pleiotropic effects. Although fine mapping is required to decipher such clusters, they could be useful in marker-assisted selection.

**References**

- Albertini M-V, Carcouet E, Pailly O, Gambotti C, Luro F, Berti L (2006) Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit *Journal of agricultural and food chemistry* 54:8335-8339
- Ashrafi H, Foolad MR (2015) Characterization of Early Blight Resistance in a Recombinant Inbred Line Population of Tomato: II. Identification of QTLs and Their Co-localization with Candidate Resistance Genes *Advanced Studies in Biology* 7:149-168
- Asins MJ, Bernet GP, Ruiz C, Cambra M, Guerri J, Carbonell EA (2004) QTL analysis of citrus tristeza virus-citradia interaction *Theoretical and Applied Genetics* 108:603-611 doi:10.1007/s00122-003-1486-7
- Bain JM (1958) Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck *Australian Journal of Botany* 6:1-23
- Baldwin EA (1993) Citrus fruit. In: Seymour G, Taylor J, Tucker G (eds) *Biochemistry of Fruit Ripening*. Springer Netherlands, pp 107-149. doi:10.1007/978-94-011-1584-1\_4
- Beavis WD QTL analyses: power, precision, and accuracy. In: *Molecular dissection of complex traits*, 1998. pp 145-162
- Calenge F, Drouet D, Denancé C, Van de Weg W, Brisset M-N, Paulin J-P, Durel C-E (2005) Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies *Theoret Appl Genetics* 111:128-135
- Causse M, Saliba-Colombani V, Lesschaeve I, Buret M (2001) Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes *Theoretical and Applied Genetics* 102:273-283
- Chen C et al. (2008) EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata* *Tree Genetics & Genomes* 4:1-10 doi:10.1007/s11295-007-0083-3
- Chen J, Wang N, Fang L-C, Liang Z-C, Li S-H, Wu B-H (2015) Construction of a high-density genetic map and QTLs mapping for sugars and acids in grape berries *BMC plant biology* 15:28
- De Vienne D, Causse M (1998) La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs *Proc Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales* Edit INRA:200
- Dirlewanger E et al. (1999) Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) *Theoret Appl Genetics* 98:18-31 doi:10.1007/s001220051035
- Doligez A et al. (2013) New stable QTLs for berry weight do not colocalize with QTLs for seed traits in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.) *BMC plant biology* 13:217
- Doyle JJ (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue *Phytochem Bull* 19:11-15
- Echeverria E, Valich J (1989) Enzymes of sugar and acid metabolism in stored Valencia oranges *Journal of the American Society for Horticultural Science (USA)*
- Etienne A, Génard M, Lobit P, Mbéguié-A-Mbéguié D, Bugaud C (2013) What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells *Journal of experimental botany* 64:1451-1469
- Etienne C et al. (2002) Candidate genes and QTLs for sugar and organic acid content in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] *Theoretical and Applied Genetics* 105:145-159 doi:10.1007/s00122-001-0841-9
- Fang DQ, Federici CT, Roose ML (1997) Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in citrus *Genome* 40:841-849 doi:10.1139/g97-809

- Froelicher Y et al. (2008) Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) *Molecular Ecology Resources* 8:119-122 doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01893.x
- Garcia-Lor A, Curk F, Morillon R, Ancillo G, Luro F, Navarro L, Ollitrault P (2012) Nuclear phylogeny within *Citrus* (Rutaceae) and four related genera *Ann Bot*
- Garcia-Luis A, Didehvar F, Guardiola J, Baker D (1991) The transport of sugars in developing fruits of satsuma mandarin *Annals of Botany* 68:349-357
- García MR, Asíns MJ, Carbonell EA (2000) QTL analysis of yield and seed number in *Citrus* *Theoretical and Applied Genetics* 101:487-493 doi:10.1007/s001220051507
- Gmitter Jr F, Grosser J, Castle W, Moore G, Khan I (2007) A comprehensive citrus genetic improvement programme *Citrus genetics, breeding and biotechnology*:9-18
- Goldman IL, Paran I, Zamir D (1995) Quantitative trait locus analysis of a recombinant inbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon cheesmanii* cross *Theoret Appl Genetics* 90:925-932 doi:10.1007/BF00222905
- Goldschmidt E, Koch K (1996) *Citrus*.
- Gomez L, Bancel D, Rubio E, Vercambre G (2007) The microplate reader: an efficient tool for the separate enzymatic analysis of sugars in plant tissues—validation of a micro-method *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:1893-1905 doi:10.1002/jsfa.2924
- Grandillo S, Ku H, Tanksley S (1999) Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato *Theoret Appl Genetics* 99:978-987
- Henderson CR, Kempthorne O, Searle SR, Von Krosigk C (1959) The estimation of environmental and genetic trends from records subject to culling *Biometrics* 15:192-218
- Iglesias DJ et al. (2007) Physiology of citrus fruiting *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19:333-362
- Jacquemond C, Curk F, Heuzet M (2013) *Les clémentiniers et autres petits agrumes*. Editions Quae,
- Jarrell DC, Roose ML, Traugh SN, Kupper RS (1992) A genetic map of citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross *Theoretical and Applied Genetics* 84:49-56 doi:10.1007/BF00223980
- Kenis K, Keulemans J, Davey MW (2008) Identification and stability of QTLs for fruit quality traits in apple *Tree Genetics & Genomes* 4:647-661
- Kosambi D (1943) The estimation of map distances from recombination values *Annals of Eugenics* 12:172-175
- Liebhart R, Kellerhals M, Pfammatter W, Jertmini M, Gessler C (2003) Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus × domestica* Borkh.) *Plant Molecular Biology* 52:511-526 doi:10.1023/A:1024886500979
- Luro FL et al. (2008) Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping *BMC genomics* 9:287
- Monforte AJ, Asíns MJ, Carbonell EA (1999) Salt tolerance in *Lycopersicon* spp. VII. Pleiotropic action of genes controlling earliness on fruit yield *Theoretical and Applied Genetics* 98:593-601 doi:10.1007/s001220051109
- Monselise S (1986) *Citrus*. In: Monselise S (ed) *Handbook of fruit set development*. CRC Press, Boca Raton edn., pp 87-108
- Ollitrault P, Luro F (1997) *Les agrumes*. In: Charrier A, Jacquot M, Hamon S, Nicolas D (eds) *Amélioration des plantes tropicales*. CIRAD-Orstom, p 623
- Ollitrault P et al. (2012a) A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping *BMC Genomics* 13:593



- Ollitrault P et al. (2012b) SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping *Bmc Genomics* 13:13
- Paterson AH (1997) *Molecular Dissection of Complex Traits*. Taylor & Francis,
- Paterson AH et al. (1991) Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments *Genetics* 127:181-197
- Quilot B, Kervella J, Génard M, Lescourret F (2005) Analysing the genetic control of peach fruit quality through an ecophysiological model combined with a QTL approach *Journal of Experimental Botany* 56:3083-3092
- Robinson GK (1991) That BLUP is a good thing: the estimation of random effects *Statistical science*:15-32
- Roose ML (2007) Mapping and marker-assisted selection. In: Khan I (ed) *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. UK, pp 275-285
- Rousseaux MC, Jones CM, Adams D, Chetelat R, Bennett A, Powell A (2005) QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines *Theoretical and Applied Genetics* 111:1396-1408
- Royston P (1995) Remark AS R94: A remark on algorithm AS 181: The W-test for normality *Applied Statistics*:547-551
- Ruiz C, Asins M (2003) Comparison between Poncirus and Citrus genetic linkage maps *Theoretical and Applied Genetics* 106:826-836 doi:10.1007/s00122-002-1095-x
- Şahin-Çevik M, Moore G (2012) Quantitative trait loci analysis of morphological traits in Citrus *Plant Biotechnol Rep* 6:47-57 doi:10.1007/s11816-011-0194-z
- Saliba-Colombani V, Causse M, Langlois D, Philouze J, Buret M (2001) Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits *Theoret Appl Genetics* 102:259-272 doi:10.1007/s001220051643
- Segura V, Durel C-E, Costes E (2009) Dissecting apple tree architecture into genetic, ontogenetic and environmental effects: QTL mapping *Tree genetics & genomes* 5:165-179
- Serquen FC, Bacher J, Staub J (1997) Mapping and QTL analysis of horticultural traits in a narrow cross in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using random-amplified polymorphic DNA markers *Molecular Breeding* 3:257-268
- Siviero A, Cristofani M, Furtado E, Garcia AF, Coelho AG, Machado M (2006) Identification of QTLs associated with citrus resistance to *Phytophthora gummosis* *Journal of Applied Genetics* 47:23-28 doi:10.1007/BF03194595
- Spiegel-Roy P, Goldschmidt EE (1996) *The biology of citrus*. Cambridge University Press,
- Stam P (1993) Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map *The Plant Journal* 3:739-744
- Staub JE, Serquen FC, Gupta M (1996) Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding *HortScience* 31:729-741
- Stenzel NMC, Neves CSVJ, Marur CJ, Scholz MBdS, Gomes JC (2006) Maturation curves and degree-days accumulation for fruits of 'Folha Murcha' orange trees *Scientia Agricola* 63:219-225
- Sugiyama A, Omura M, Matsumoto H (2011) Quantitative trait loci (QTL) analysis of carotenoid content in Citrus fruit *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 80:136-144
- Terol J, Naranjo MA, Ollitrault P, Talon M (2008) Development of genomic resources for *Citrus clementina*: characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences *BMC genomics* 9:423
- Ting S, Attaway J (1971) Citrus fruits *The biochemistry of fruits and their products* 2:107-169

- Tozlu I, Guy CL, Moore GA (1999) QTL analysis of Na<sup>+</sup> and Cl-accumulation related traits in an intergeneric BC1 progeny of Citrus and Poncirus under saline and nonsaline environments *Genome* 42:692-705
- Van Ooijen J (2006) JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations Kyazma BV, Wageningen 33
- Van Ooijen J (2009) MapQTL 6 Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species Kyazma BV: Wageningen, Netherlands
- Verde I, Quarta R, Cedrola C, Dettori M (2002) QTL analysis of agronomic traits in a BC1 peach population *Acta Horticulturae*
- Voorrips RE (2002) MapChart: Software for the Graphical Presentation of Linkage Maps and QTLs *Journal of Heredity* 93:77-78 doi:10.1093/jhered/93.1.77
- Wu GA et al. (2014) Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication *Nature biotechnology*

**Table 1.** Transformations of raw phenotypic values to unskew distributions, and broad sense heritability

Fruit traits	Sampling dates	Transformations	Heritability ( $H^2$ )
Fruit mass (g)	October 2012	ln	0.81
	December 2012	-	0.81
	February 2013	ln	0.80
Equatorial diameter (mm)	October 2012	ln	0.79
	December 2012	-	0.80
	February 2013	ln	0.73
Juice percentage (%)	October 2012	-	0.82
	December 2012	-	0.75
	February 2013	-	0.8
pH	October 2012	-	0.67
	December 2012	ln	0.94
	February 2013	-	0.89
Acidity (g/100g)	October 2012	ln	0.81
	December 2012	-	0.65
	February 2013	ln	0.75
TSS	October 2012	square root	0.82
	December 2012	ln	0.71
	February 2013	Square	0.61
Citric acid DM	October 2012	Square	0.78
	December 2012	ln	0.73
	February 2013	ln	0.83
Citric acid FM	October 2012	Square	0.78
	December 2012	ln	0.74
	February 2013	ln	0.82
Malic acid DM	October 2012	ln	0.79
	December 2012	ln	0.81
	February 2013	Square	0.77
Malic acid FM	October 2012	ln	0.79
	December 2012	ln	0.73
	February 2013	ln	0.85
Glucose DM	October 2012	Square	0.64
	December 2012	-	0.60
	February 2013	Square	0.75
Glucose FM	October 2012	Square	0.67
	December 2012	-	0.56

	February 2013	ln	0.82
	October 2012	-	0.68
Fructose DM	December 2012	-	0.63
	February 2013	Square	0.73
	October 2012	Square	0.70
Fructose FM	December 2012	-	0.59
	February 2013	Square	0.72
	October 2012	-	0.71
Sucrose DM	December 2012	-	0.50
	February 2013	-	0.61
	October 2012	Square	0.74
Sucrose FM	December 2012	-	0.54
	February 2013	Square	0.62

DM: Dry matter/FM: Fresh matter/ (-) No transformation/ ln: neperian logarit

**Table2.** Mean values, standard deviations and phenotypic range of agronomic traits for parents and progeny

Trait	Sampling dates	Mandarin mean	Clementine mean	ClementinexMandarin population			
				Mean	Standard Deviation	Min	Max
Fruit mass (g)	October 2012	39.4	39.1	32.3	9.7	15.6	69.9
	December 2012	59.4	80	58.6	16.7	22.1	109.9
	February 2013	82.4	84.9	58.0	17.3	27.0	107.1
Juice percentage (%)	October 2012	35.4	37.8	26.4	7.8	9.7	51.3
	December 2012	42.2	32.8	30.1	8.8	12.5	46.6
	February 2013	37.4	24.3	19.0	8.8	0.1	39.9
pH	October 2012	2.7	3.3	2.9	0.1	2.7	3.3
	December 2012	2.7	3.4	3.6	0.7	2.7	6.1
	February 2013	3.7	4.7	4.7	0.6	3.6	6.7
TSS (°Brix)	October 2012	9.4	9.9	8.2	1.2	6.4	11.2
	December 2012	8.6	8.4	8.7	0.9	6.1	11.6
	February 2013	10.4	8.6	10.0	1.4	7.0	14.6
Acidity (g/100g)	October 2012	5.6	1.5	3.1	1.2	0.9	6.5
	December 2012	3.0	0.7	1.1	0.3	0.4	3.1
	February 2013	1.0	0.3	0.6	0.3	0.1	1.6
Equatorial	October 2012	43.2	43.0	39.7	4.0	31.2	48.3

diameter	December 2012	48.9	59.0	49.6	5.0	36.0	64.8
(mm)	February 2013	56.8	60.5	51.1	5.5	39.5	63.3

**Table 3.** Mean values, standard deviations and phenotypic range of acid and sugar contents in parents and progeny.

Traits	%	Sampling dates	Mandarin mean	Clementine mean	ClementinexMandarin population			
					Mean	Standard Deviation	Min	Max
Glucose	DM	October 2012	3.0	5.8	5.0	1.6	1.4	8.5
		December 2012	7.3	8.1	7.1	1.4	3.3	11.9
		February 2013	5.7	7.8	6.9	2.1	3.1	14.2
	FM	October 2012	0.4	0.6	0.6	0.2	0.0	1.4
		December 2012	1.1	0.9	0.9	0.2	0.1	1.7
		February 2013	0.8	0.9	1.2	1.0	0.3	6.6
Fructose	DM	October 2012	2.7	7.8	5.3	1.9	0.8	9.3
		December 2012	5.2	10.7	8.3	1.7	4.2	13.6
		February 2013	6.6	9.3	8.5	2.2	4.6	16.3
	FM	October 2012	0.3	0.8	0.6	0.2	0.1	1.5
		December 2012	0.8	1.2	1.0	0.2	0.2	1.9
		February 2013	0.9	1.1	1.5	1.2	0.5	8.1
Sucrose	DM	October 2012	6.3	27.4	19.6	6.6	5.3	33.0
		December 2012	26.0	41.0	38.6	5.0	27.1	51.6
		February 2013	42.9	34.7	40.9	5.6	26.5	52.8
	FM	October 2012	0.9	2.8	2.3	1.0	0.2	6.0
		December 2012	3.9	4.8	4.9	0.9	1.4	7.6
		February 2013	6.1	4.2	7.2	5.7	2.1	46.7
Malic acid	DM	October 2012	2.1	2.5	0.9	0.4	0.2	2.5
		December 2012	0.6	2.9	1.3	0.4	0.4	2.9
		February 2013	0.6	2.9	1.3	0.4	0.5	2.5
	FM	October 2012	0.3	0.2	0.1	0.0	0.0	0.3
		December 2012	0.1	0.3	0.1	0.0	0.0	0.3
		February 2013	0.0	0.3	0.2	0.1	0.0	0.7
Citric acid	DM	October 2012	21.1	8.3	13.9	4.6	4.3	26.8
		December 2012	17.2	3.4	5.7	2.5	1.5	19.3
		February 2013	5.4	1.7	2.9	1.4	0.6	8.2
	FM	October 2012	3.0	0.8	1.6	0.6	0.1	3.4
		December 2012	2.637	0.2	0.7	0.3	0.1	2.4
		February 2013	0.788	0.2	0.4	0.2	0.0	1.6

DM: Dry matter/FM: Fresh matt

**Table 4.** Genotypic correlations (Spearman  $r$ ) between fruit characteristics measured during maturation in 10/08/2012 (first value), 12/03/2012 (second value) and 02/27/2013 (third value) based on genotypic BLUPs. Significant correlations are in bold.

	Fruit weight (g)	Equatorial diameter (mm)	Juice percentage (%)	TSS (°Brix)	Acidity (g/100g)	pH	Glucose (DM)	Glucose (FM)	Fructose (DM)	Fructose (FM)	Sucrose (DM)	Sucrose (FM)	Malic acid (DM)	Malic acid (FM)	Citric acid (DM)	Citric acid (FM)
Equatorial diameter (mm)	<b>0.97</b> <b>0.95</b> <b>0.89</b>	1.00														
Juice percentage	<b>0.55</b> 0.16 -0.17	<b>0.55</b> 0.08 -0.17	1.00													
TSS (°Brix)	<b>0.33</b> -0.05 -0.03	<b>0.32</b> -0.06 -0.17	<b>0.27</b> 0.17 <b>0.23</b>	1.00												
Acidity (g/100)	<b>-0.60</b> <b>-0.45</b> <b>-0.32</b>	<b>-0.63</b> <b>-0.49</b> <b>-0.49</b>	<b>-0.42</b> <b>0.23</b> <b>0.37</b>	-0.14 <b>0.21</b> <b>0.40</b>	1.00											
pH	<b>0.44</b> 0.13 <b>0.19</b>	<b>0.49</b> <b>0.22</b> <b>0.39</b>	<b>0.26</b> <b>-0.40</b> <b>-0.44</b>	0.18 <b>-0.22</b> <b>-0.31</b>	<b>-0.72</b> <b>-0.57</b> <b>-0.76</b>	1.00										
Glucose (% DM)	<b>0.38</b> 0.00 0.05	<b>0.38</b> -0.06 -0.02	<b>0.48</b> 0.04 0.02	<b>0.33</b> <b>0.35</b> 0.16	<b>-0.54</b> -0.04 -0.16	<b>0.33</b> -0.07 0.01	1.00									
Glucose (% FM)	<b>0.24</b> -0.13 0.06	<b>0.25</b> <b>-0.19</b> -0.03	<b>0.26</b> -0.07 -0.10	0.10 <b>0.42</b> 0.14	<b>-0.46</b> 0.11 <b>-0.29</b>	<b>0.20</b> -0.16 0.17	<b>0.76</b> <b>0.85</b> <b>0.78</b>	1.00								

	<b>0.46</b>	<b>0.45</b>	<b>0.48</b>	<b>0.32</b>	<b>-0.60</b>	<b>0.40</b>	<b>0.93</b>	<b>0.68</b>							
Fructose	0.04	0.00	0.00	<b>0.30</b>	-0.15	0.05	<b>0.94</b>	<b>0.77</b>							
(% DM)	0.04	0.00	-0.04	0.04	<b>-0.23</b>	0.11	<b>0.95</b>	<b>0.76</b>	1.00						
	<b>0.35</b>	<b>0.35</b>	<b>0.30</b>	0.11	<b>-0.54</b>	<b>0.29</b>	<b>0.75</b>	<b>0.93</b>	<b>0.80</b>						
Fructose	<b>0.66</b>	<b>0.60</b>	0.18	<b>0.21</b>	<b>-0.33</b>	0.03	<b>0.55</b>	<b>0.50</b>	<b>0.59</b>						
(% FM)	0.05	-0.01	-0.16	0.08	<b>-0.34</b>	<b>0.25</b>	<b>0.74</b>	<b>0.98</b>	<b>0.77</b>	1.00					
	<b>0.49</b>	<b>0.51</b>	<b>0.46</b>	<b>0.31</b>	<b>-0.73</b>	<b>0.57</b>	<b>0.77</b>	<b>0.57</b>	<b>0.86</b>	<b>0.70</b>					
Sucrose	<b>0.24</b>	<b>0.27</b>	0.02	<b>0.24</b>	<b>-0.28</b>	<b>0.22</b>	0.17	0.16	<b>0.20</b>	<b>0.31</b>					
(% DM)	0.10	0.00	0.13	<b>0.44</b>	0.09	-0.16	<b>-0.27</b>	-0.16	<b>-0.32</b>	<b>-0.20</b>	1.00				
	<b>0.39</b>	<b>0.40</b>	<b>0.26</b>	0.10	<b>-0.64</b>	<b>0.44</b>	<b>0.61</b>	<b>0.81</b>	<b>0.68</b>	<b>0.89</b>	<b>0.80</b>				
Sucrose	0.01	0.02	-0.15	<b>0.35</b>	-0.07	0.09	0.16	<b>0.37</b>	0.14	<b>0.21</b>	<b>0.76</b>				
(% FM)	0.07	-0.04	0.00	<b>0.31</b>	-0.13	0.10	-0.09	<b>0.38</b>	-0.11	<b>0.37</b>	<b>0.58</b>	1.00			
	<b>0.21</b>	<b>0.27</b>	<b>0.21</b>	-0.01	<b>-0.39</b>	<b>0.33</b>	0.08	0.00	0.18	0.11	<b>0.34</b>	<b>0.21</b>			
Malic acid	<b>0.25</b>	<b>0.32</b>	-0.15	<b>-0.21</b>	<b>-0.41</b>	<b>0.35</b>	-0.01	-0.16	0.12	0.09	0.14	-0.08			
(% DM)	-0.02	0.16	<b>-0.40</b>	<b>-0.34</b>	<b>-0.40</b>	<b>0.42</b>	0.12	0.05	<b>0.22</b>	0.12	<b>-0.28</b>	<b>-0.24</b>	1.00		
	0.13	<b>0.19</b>	0.07	-0.13	<b>-0.36</b>	<b>0.24</b>	0.03	<b>0.27</b>	0.11	<b>0.35</b>	<b>0.27</b>	<b>0.45</b>	<b>0.83</b>		
Malic acid	0.18	<b>0.25</b>	<b>-0.23</b>	-0.12	<b>-0.35</b>	<b>0.32</b>	-0.01	-0.01	0.10	0.13	0.15	0.06	<b>0.95</b>		
(% FM)	0.08	<b>0.19</b>	<b>-0.40</b>	<b>-0.19</b>	<b>-0.53</b>	<b>0.58</b>	0.11	<b>0.38</b>	<b>0.20</b>	<b>0.46</b>	-0.15	<b>0.27</b>	<b>0.76</b>	1.00	
	<b>-0.43</b>	<b>-0.46</b>	-0.16	<b>-0.27</b>	<b>0.72</b>	<b>-0.72</b>	<b>-0.39</b>	<b>-0.33</b>	<b>-0.47</b>	<b>-0.43</b>	<b>-0.63</b>	<b>-0.57</b>	-0.17	-0.18	
Citric acid	<b>-0.41</b>	<b>-0.47</b>	<b>0.21</b>	-0.02	<b>0.74</b>	<b>-0.56</b>	-0.18	-0.10	<b>-0.31</b>	<b>-0.45</b>	<b>-0.39</b>	<b>-0.26</b>	<b>-0.47</b>	<b>-0.46</b>	
(% DM)	<b>-0.27</b>	<b>-0.46</b>	<b>0.49</b>	<b>0.20</b>	<b>0.68</b>	<b>-0.70</b>	-0.18	<b>-0.21</b>	<b>-0.27</b>	<b>-0.29</b>	0.09	-0.02	<b>-0.52</b>	<b>-0.54</b>	.00
	<b>-0.39</b>	<b>-0.41</b>	<b>-0.28</b>	<b>-0.35</b>	<b>0.55</b>	<b>-0.63</b>	<b>-0.36</b>	0.05	<b>-0.44</b>	-0.07	<b>-0.56</b>	-0.17	<b>-0.21</b>	0.10	<b>0.77</b>
Citric acid	<b>-0.48</b>	<b>-0.53</b>	0.13	0.07	<b>0.79</b>	<b>-0.56</b>	-0.16	0.03	<b>-0.30</b>	<b>-0.40</b>	<b>-0.40</b>	-0.14	<b>-0.53</b>	<b>-0.44</b>	<b>0.95</b>
(% FM)	-0.17	<b>-0.40</b>	<b>0.41</b>	<b>0.27</b>	<b>0.40</b>	<b>-0.40</b>	-0.12	0.19	-0.17	0.14	0.14	<b>0.46</b>	<b>-0.50</b>	-0.15	<b>0.76</b>

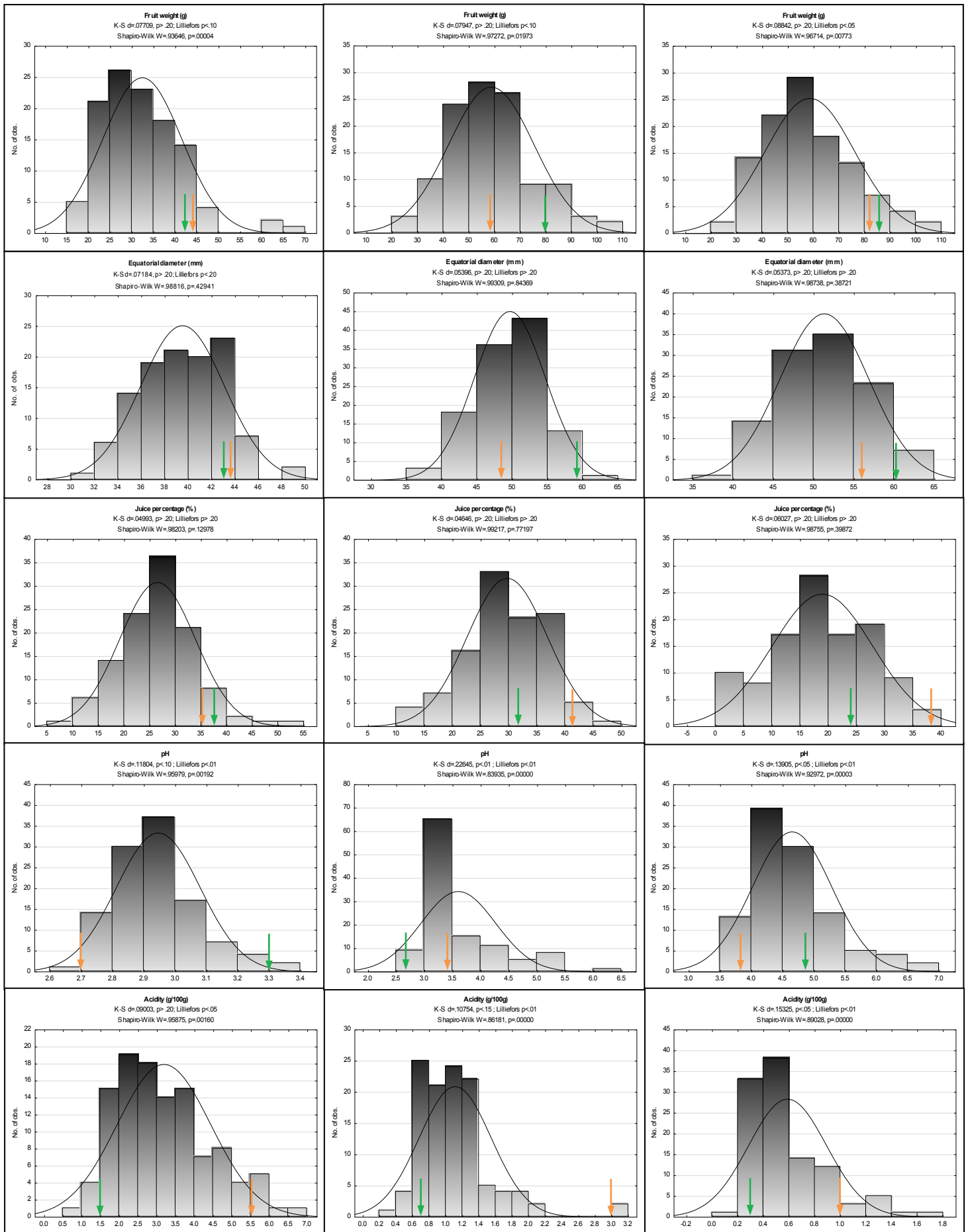
**Table 5.** List of QTLs detected on the consensus map

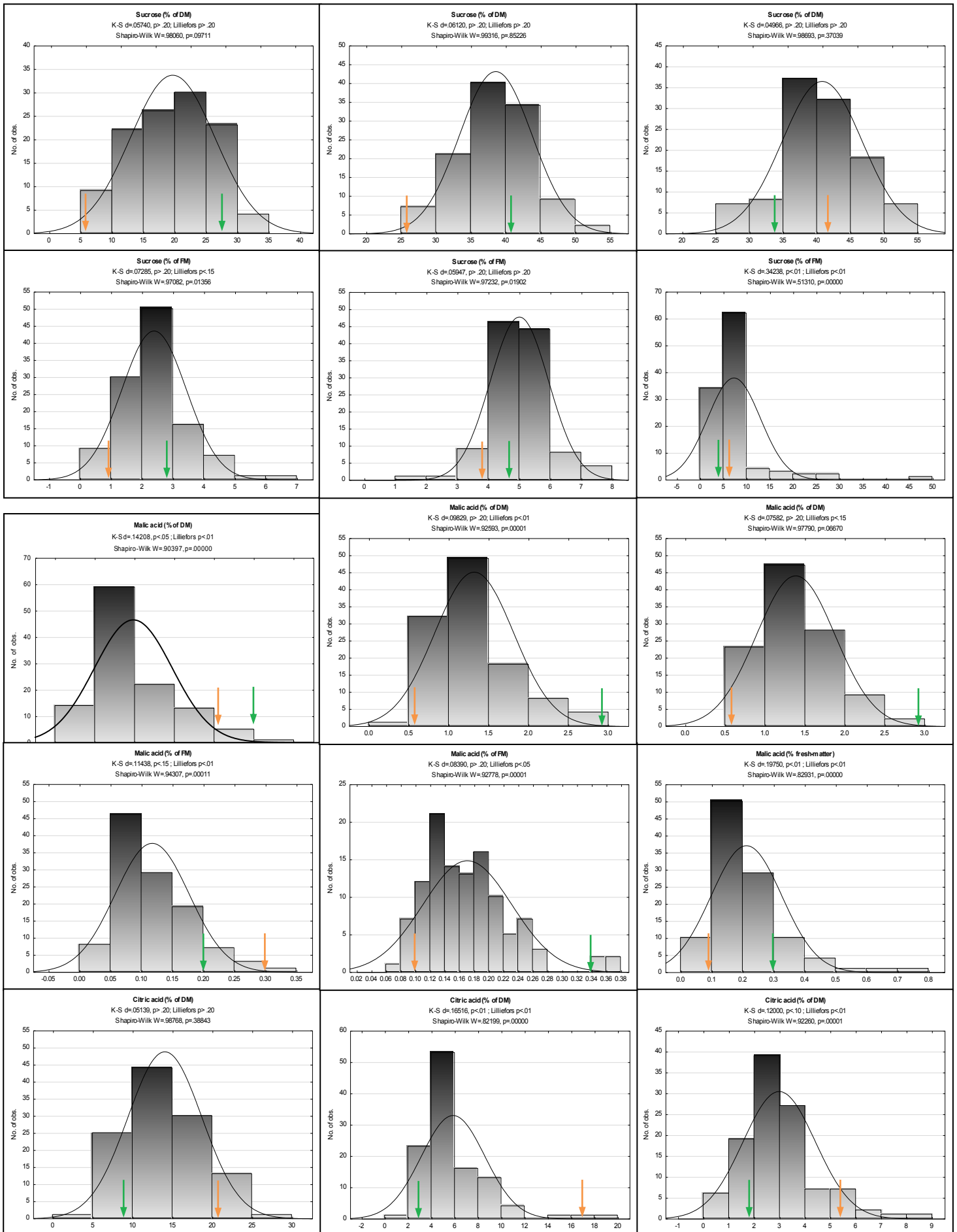
Traits	Date	LG	Max LOD peak	LOD GW	Nearest marker	Map position (cM)	Confidence interval	R <sup>2</sup> (%)	Kruskal- Wallis analysis	
Fruit mass (g)	October 2012	2	5.1	4.1	CiC5209-05	118.9	116.9-120.8	21	*****	
		4	4.6	4.1	CiC0279-03	1.0	0.0/7.3	15	****	
		5	4.1	4.1	CiC1891-02	0.0	0.0-5.9	14	*****	
	December 2012	8	5.2	4.1	CiC0598-01	10.8	8.6/13.7	19	*****	
	February 2013	2	5.3	4.2	PKF-M-186	118.9	116.9/120.8	17	*****	
		3	5.3	4.2	CiC5796-12	85.4	83.6-86.4	13	****	
		8	6.9	4.2	CiC0100-04	44.7	41.0/48.7	23	*****	
	Equatorial diameter (mm)	October 2012	2	4.5	4.2	PKF-M-186	118.9	116.9-120.8	19	*****
			4	4.7	4.2	CHI-M-170	0.0	0.0-3.6	16	****
February 2013		2	4.4	4.2	PKF-M-186	119.3	116.9-120.8	14	*****	
		8	7.6	4.2	CiC0100-04	45.7	41.8/48.7	25	*****	
Juice percentage	December 2012	9	6.8	4.2	MEST1201	52.7	46.7-56.3	27	*****	
pH	October 2012	2	3.7	3.5	CiC3457-01	124.8	122.3-124.8	16	*****	
	December 2012	7	6.5	4.4	CiC5979-03	0.0	0.0-2.0	26	****	
TSS (°Brix)	February 2013	8	4.3	4.3	LCY2-P- 243	49.8	48.7-50.1	20	*****	
Acidity (g/100g)	October 2012	2	4.0	4	CiC3457-01	124.8	119.3-124.8	18	*****	
Malic acid DM	October 2012	8	5.9	4.2	CiC0598-01	11.8	8.6-13.7	24	*****	
	December 2012	8	4.4	4.2	MEST086	16.7	13.3-18.9	19	****	
Citric acid DM	October 2012	2	5.9	4.2	PKF-M-186	118.9	116.9-120.8	24	*****	
	December 2012	4	4.7	3.5	CiC5078-07	4.6	0.0-9.0	20	****	
		9	3.6	3.5	CiC2768-01	69.0	64.1-86.6	16	*****	
Malic acid FM	February 2013	1	4.1	4.6	Ci04E02r	36.9	34.3-38.9	19	***	
Glucose DM	February 2013	9	8.1	4.3	MEST149	58.2	56.6-60.0	33	*****	
Fructose	December	2	4.7	4.2	CiC6122-04	108.4	99.5-111.2	27	*****	

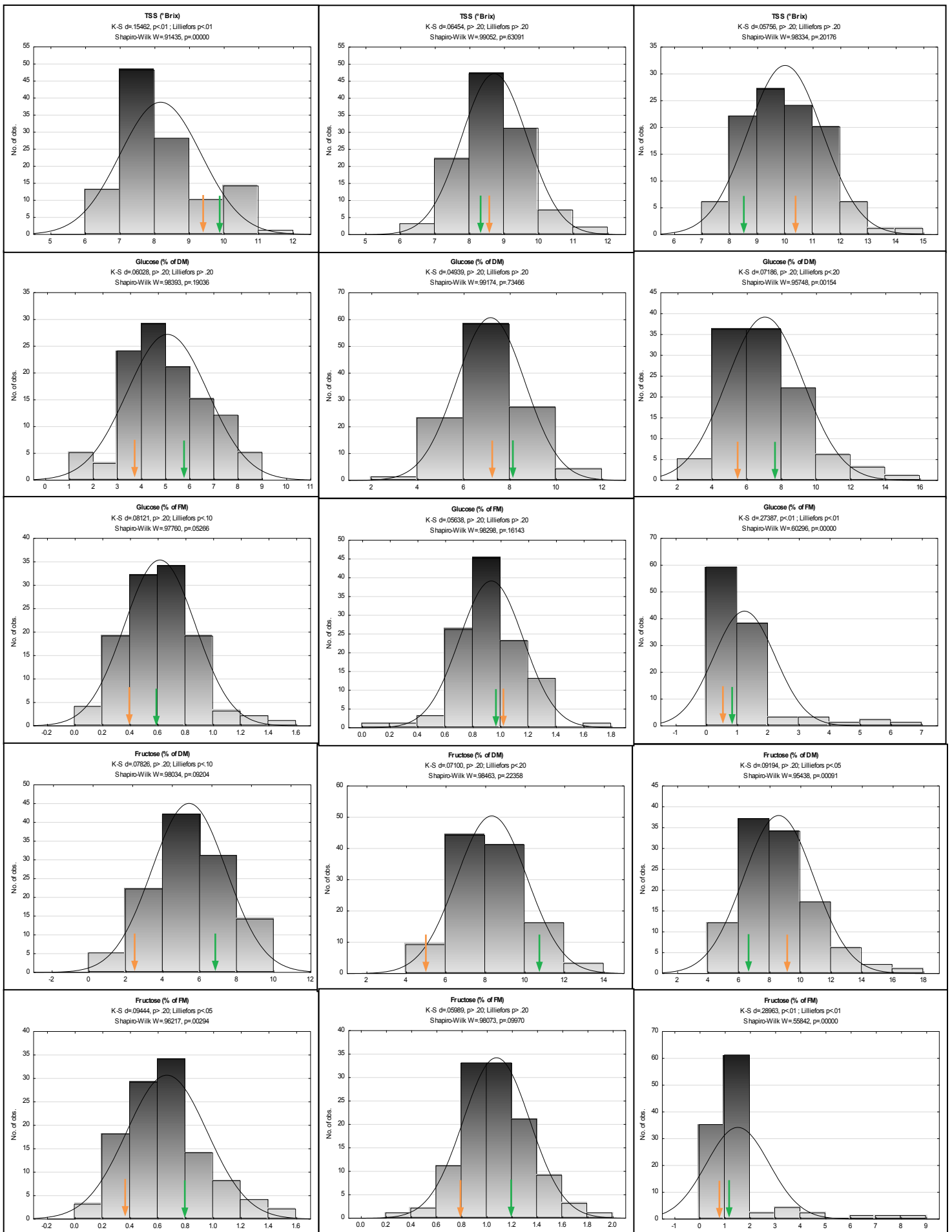


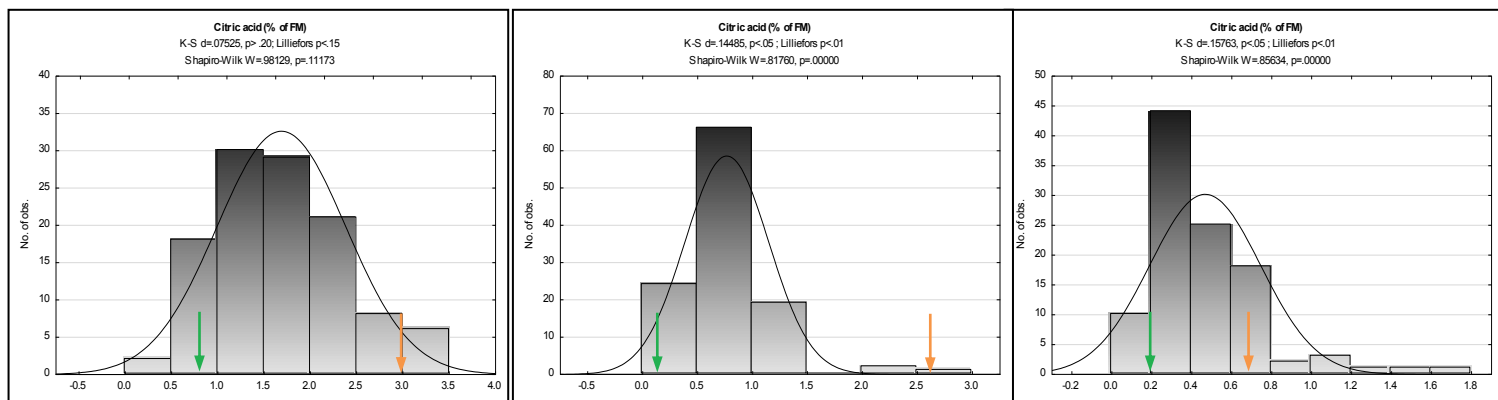
DM	2012	3	4.6	4.2	CiC3742-04	4.6	3.3-7.6	15	****
	February 2013	9	8.3	4.3	MEST149	57.6	56.6-59.2	34	*****
Sucrose DM	February 2013	9	5.4	4.3	CiC5567-01	66.2	65.2-68.5	24	*****
Fructose FM	December 2012	9	4.2	4.2	MEST149	57.6	56.6-59.2	18	*****
Sucrose FM	December 2012	5	4.2	4.2	CiC3536-01	65.7	64.6-67.7	18	****

DM: Dry matter/FM: Fresh matter/LG: Linkage group/GW: Genome wide Significance levels \*\*\*\*\*:0.005 \*\*\*\*\*:0.001 \*\*\*\*\*:0.0005 \*\*\*\*\*:0.0001

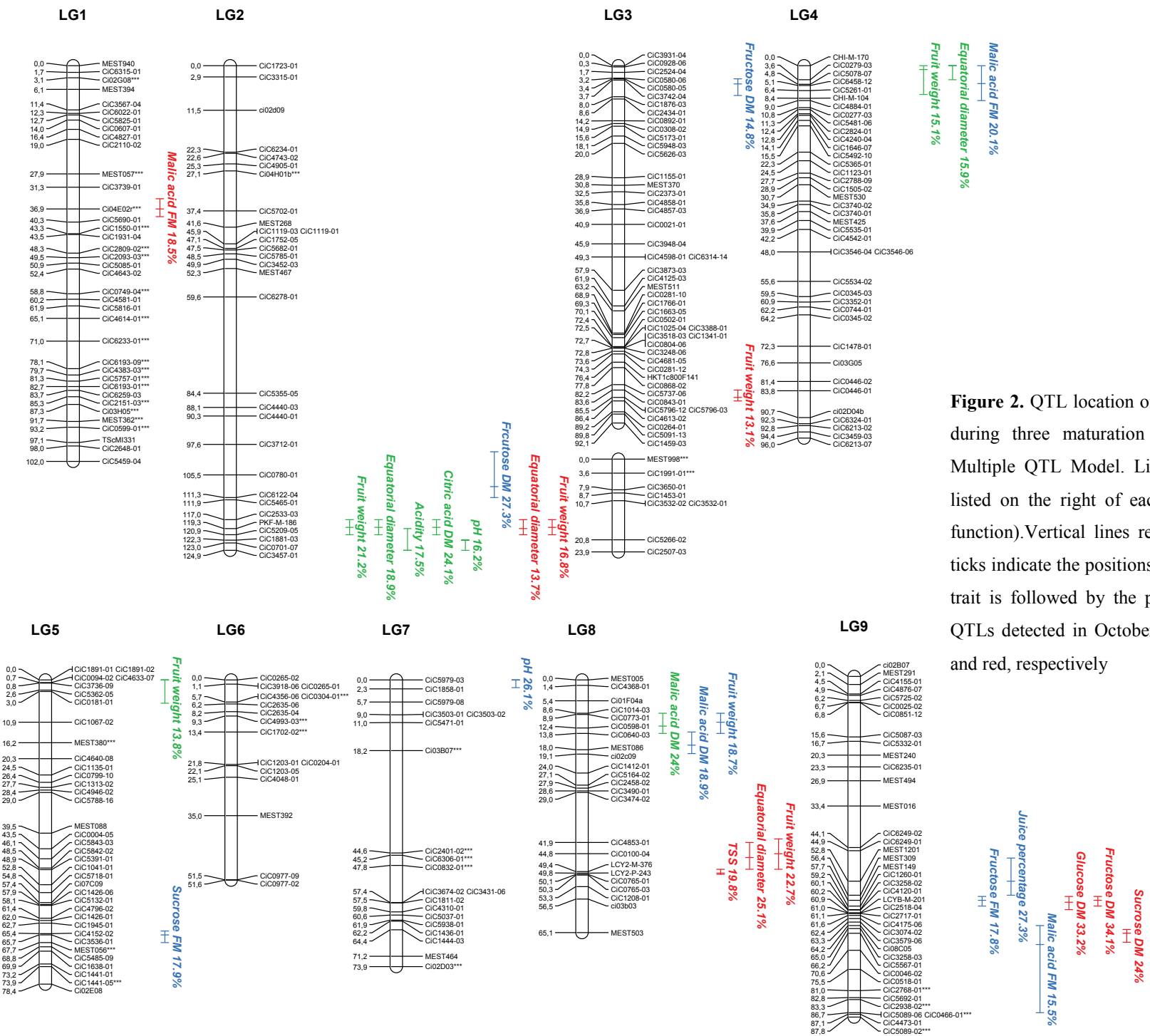






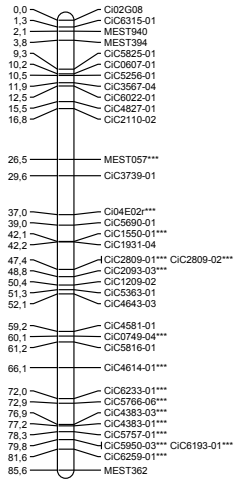


**Figure 1.** Distribution of raw phenotypes for fruit attributes in the CxM population measured in 10/08/2012 (first column), 12/03/2012 (second column) and 02/27/2013 (third column). Y axis= number of genotypes in class. Mean values of the two parents are indicated by arrows: clementine (green) and mandarin (orange).



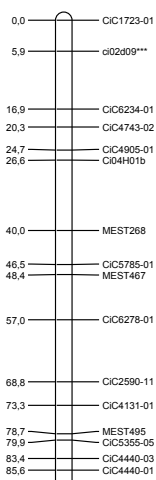
**Figure 2.** QTL location on consensus genetic map for fruit attributes analyzed during three maturation dates and determined by Interval Mapping and Multiple QTL Model. Linkage groups are labelled as LG1-LG9. QTLs are listed on the right of each linkage group. Distances are in cM (Kosambi's function). Vertical lines represent LOD-1 confidence intervals and horizontal ticks indicate the positions of the LOD peaks. For each confidence interval, the trait is followed by the percentage of total variance explained by the QTL. QTLs detected in October, December and February are drawn in green, blue and red, respectively

LG1



Fruit weight 16.6%  
Malic acid DM 20.1%

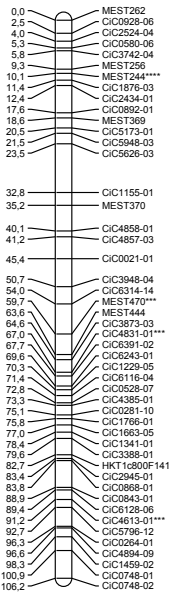
LG2



Fruit weight 17.1%  
Fructose FM 18.3%  
Equatorial diameter 15.2%  
Fruit weight 11.7%  
pH 17.3%

Equatorial diameter 19%  
Acidity 19.2%  
pH 19.9%  
Citric acid DM 24.2%

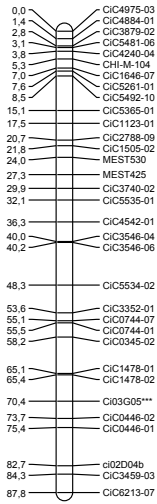
LG3



Fruit weight 12%

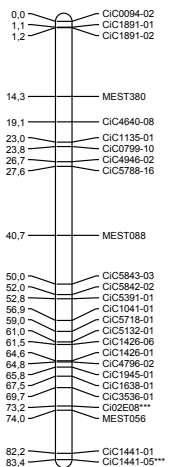
pH 17.3%

LG4



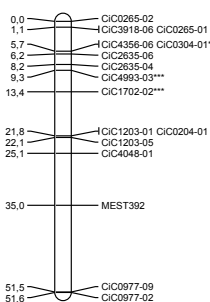
Malic acid DM 19.4%  
Malic acid FM 23.2%

LG5

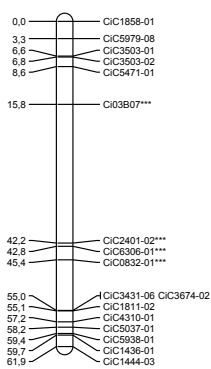


Fruit weight 13.5%

LG6

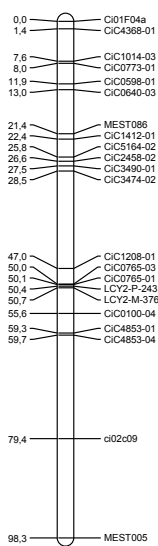


LG7



pH 26.6%

LG8



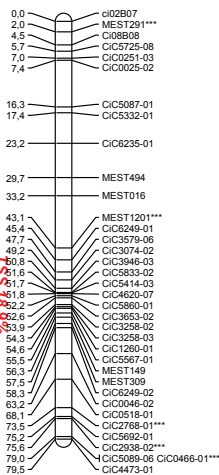
Malic acid DM 16.5%

Malic acid DM 14.8%

Equatorial diameter 24.5%

Acidity 19.8%

LG9



Juice percentage 28.3%

Fructose FM 18.2%

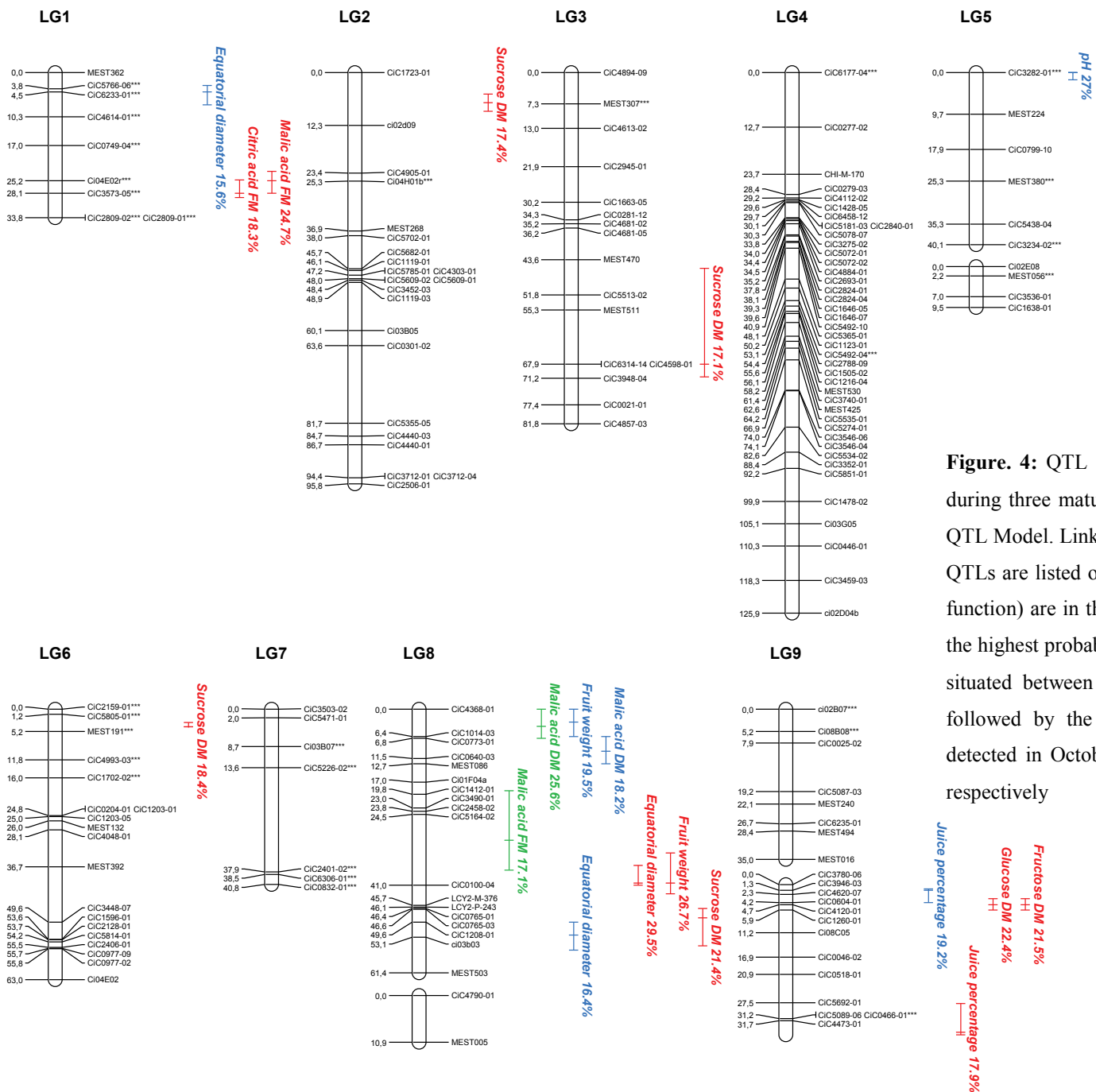
Glucose DM 33.9%

Sucrose DM 25.9%

Fructose DM 37%

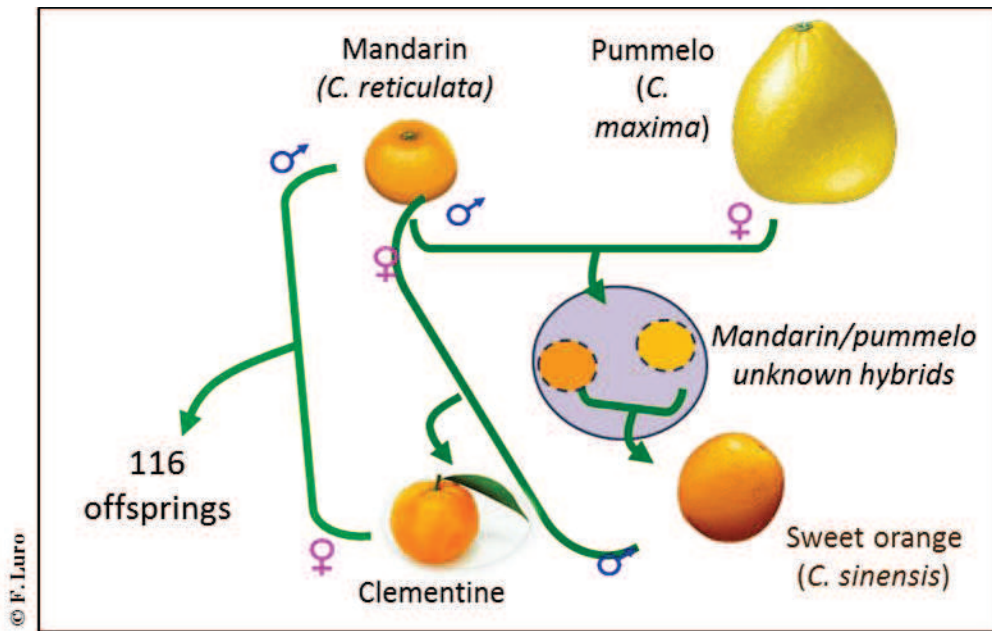
Fructose FM 33.9%

Malic acid FM 15.6%



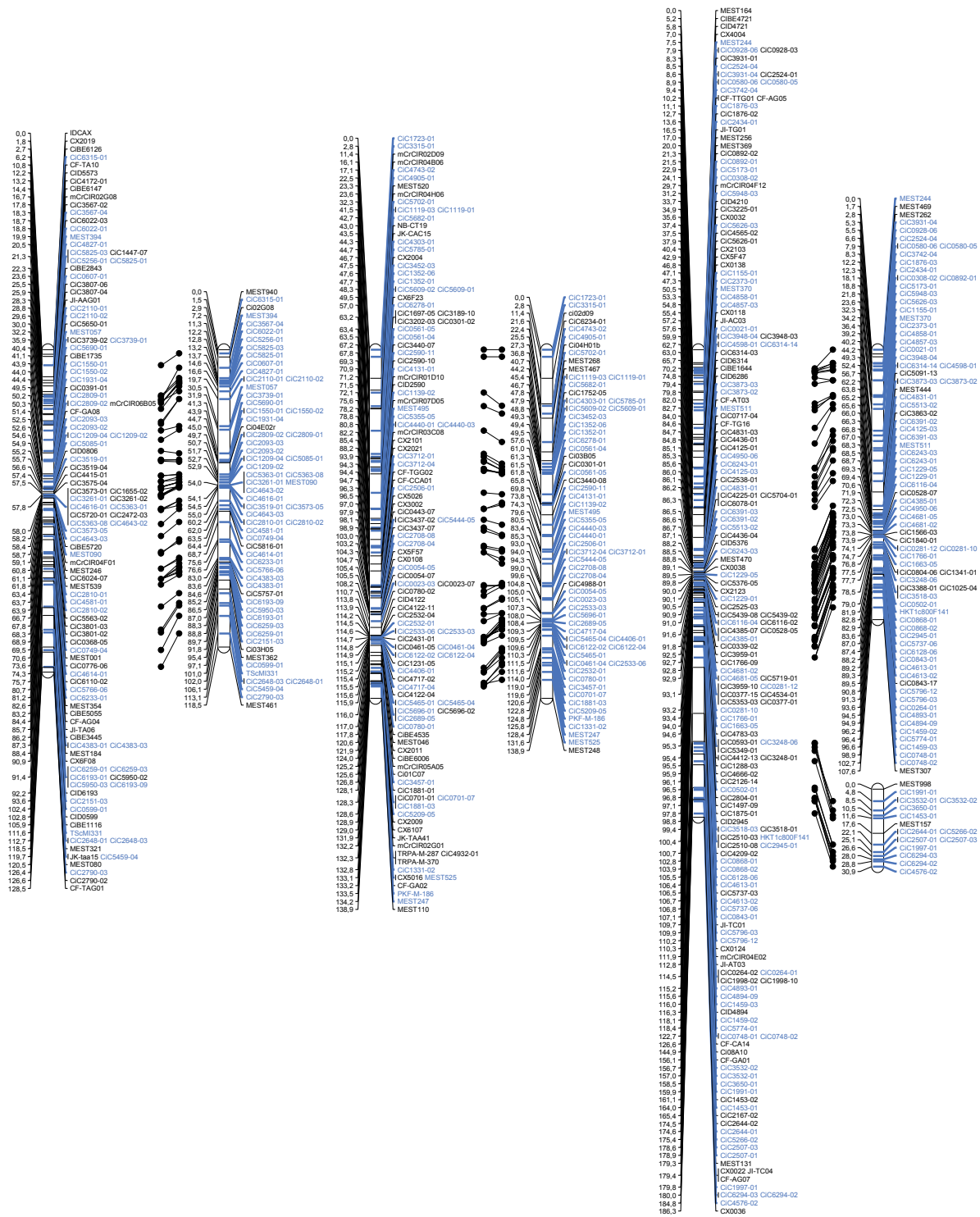
**Figure 4:** QTL location on mandarin genetic map for fruit attributes analyzed during three maturation dates and determined by Interval Mapping and Multiple QTL Model. Linkage groups are labelled as LG1-LG9. Names of the markers and QTLs are listed on the right of each linkage group. Distances in cM (Kosombi's function) are in the left of each linkage group. With respect to QTL localization the highest probability is indicated by vertical line within the confidence interval situated between two vertical lines. For each confidence interval, the trait is followed by the percentage of total variance explained by the QTL. QTLs detected in October, December and February are drawn in green, blue and red respectively



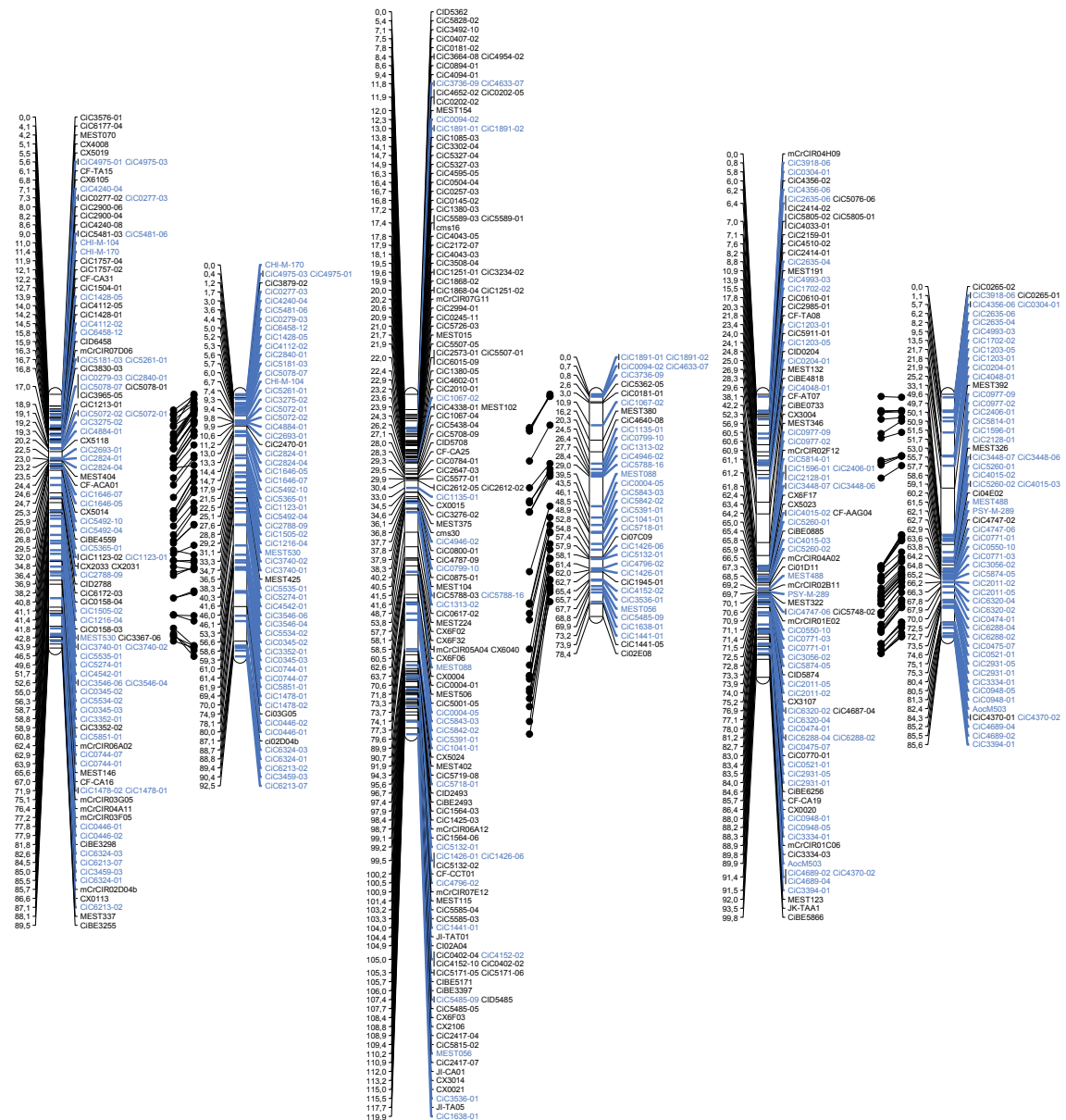


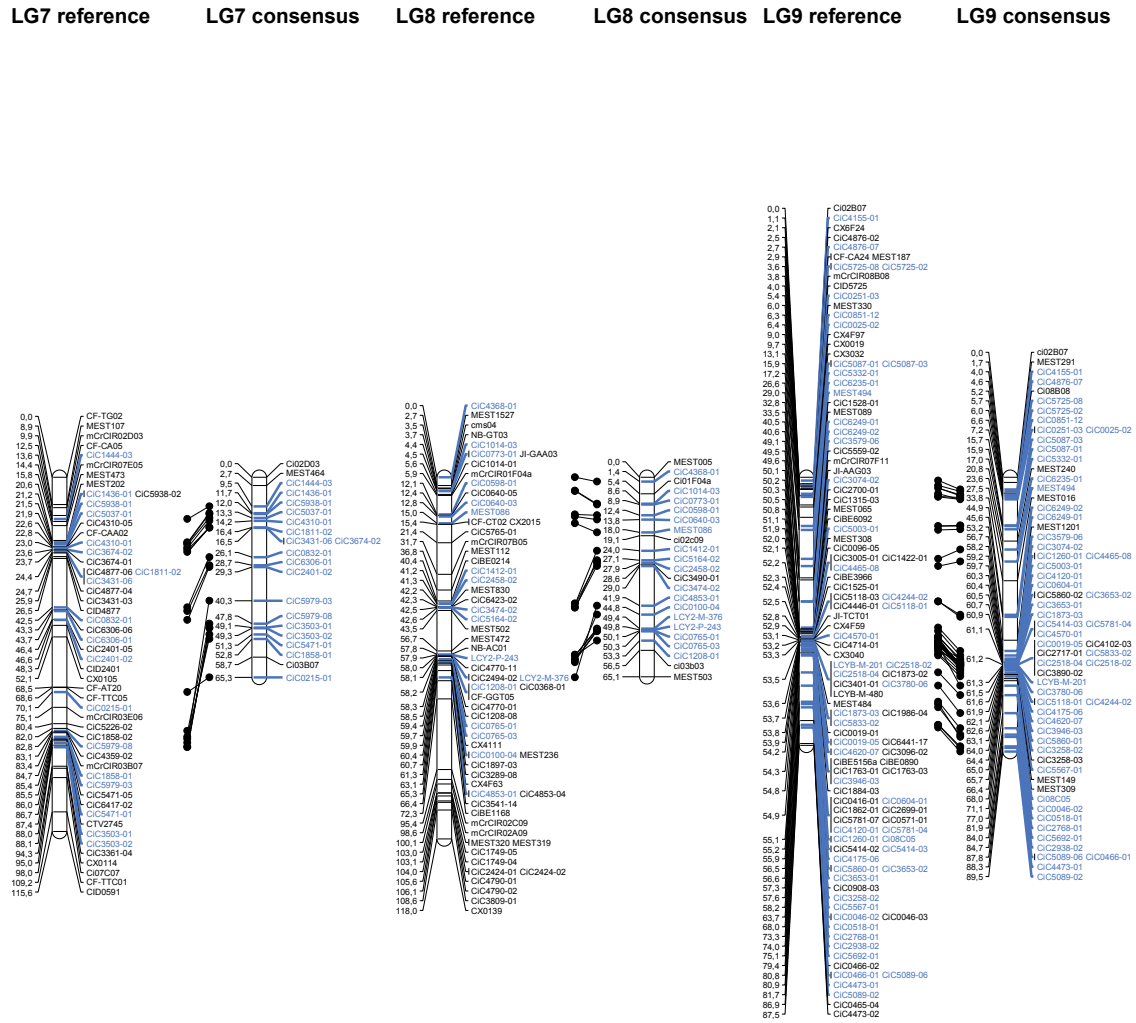
Additional figure 1. Population clementine x mandarin pedigree

LG1 reference LG1 consensus LG2 reference LG2 consensus LG3 reference LG3 consensus



GL4 reference LG4 consensus LG5 reference LG5 consensus LG6 reference LG6 consensus





Additional figure 2. Comparison between citrus reference and consensus maps Common markers between citrus reference and consensus map are written in blue

Additional table1. QTLs detected in parental maps

Parental map	Traits	Sampling dates	Linkage group	Max LOD peak	Map position (cM)	Confidence interval	R <sup>2</sup> (%)
Mandarin map	Fruit mass (g)	December 2012	8	5.4	3.0	0.0-6.3	20
		February 2013	8	6.4	40.5	33.5-42.9	27
	Equatorial diamter (mm)	October 2012	1	4.2	4.4	3.0-7.4	16
			8	4.4	52.5	49.5-56.1	16
		February 2013	8	7.2	40.5	36.5-40.9	30
	Juice percentage (%)	October 2012	4	4.5	1.3	1.0-4.1	19
		February 2013	9	4.0	34.3	27.6-34.9	18
	PH	December 2012	7	6.7	40.1	38.3-40.1	27
	Malic acid DM	October 2012	8	6.3	4.0	0.0-6.8	26
		December 2012	8	4.2	9.8	6.3-12.7	18
	Malic acid FM	October 2012	8	4.0	30.51	19.0-37.5	17
		February 2013	1	5.7	25.2	22.9-28.0	25
	Citric acid FM	February 2013	1	4.0	28.0	24.9-29.0	18
	Glucose DM	February 2013	9	5.1	4.6	3.2-5.9	22
	Fructose DM	February 2013	9	4.8	4.6	3.2-5.9	22
	Sucrose DM	February	2	4.3	7	5.0-9.0	17

	2013	3	4.2	67.9	45.5-70.9	17	
		6	4.0	63.0	60.8-63.0	18	
		8	5.4	48.5	46.4-55.1	21	
	October 2012	2	5.0	122.5	115.0-122.5	17	
		5	4.1	1.0	0.0-1.1	14	
	December 2012	8	4.8	0.0	0.0-1.4	17	
Fruit mass (g)		1	4.6	37.0	33.5-38.9	12	
	February 2013	2	5.2	122.5	119.6-121.5	17	
		3	4.8	81.5	78.3-89.4	12	
		8	6.9	58.5	54.7-59.6	23	
	October 2012	2	4.5	121.5	119.6-121.5	19	
Equatorial diameter (mm)	February 2013	2	4.9	118.6	116.0-120.6	15	
		8	7.4	59.6	58.5-65.6	25	
Clementine map	Juice percentage (%)	December 2012	9	7.1	43.0	40.2-45.0	28
		October 2012	2	4.6	116.3	113.0-118.6	20
	PH	December 2012	3	4.1	6.6	5.0-9.6	17
			7	6.6	61.7	59.3-61.8	27
	TSS (°Brix)	February 2013	8	4.1	50.7	50.0-53.7	19
	Acidity (g/100g°)	October 2012	2	4.48	115.0	111.0-118.6	19
		December 2012	8	4.74	67.6	55.6-77.6	20
	Malic acid DM	October 2012	8	5.77	9.9	7.5-12.9	24
		December	4	4.6	7.5	6.2-8.4	19

---

	2012	8	4.3	10.9	0.0-22.3	15
	February 2013	1	4.5	37.0	34.5-38.9	20
Malic acid FM	December 2012	4	6.8	6.2	3.8-7.0	23
		9	4.7	73.4	68.05-75.1	16
Citric acid DM	October 2012	2	5.9	122.5	119.6-122.5	24
Glucose DM	February 2013	9	8.3	55.5	54.5-56.3	34
Fructose DM	February 2013	9	9.2	55.5	54.5-56.3	37
Fructose FM	December 2012	2	4.3	121.6	118.3-121.6	18
Fructose FM	December 2012	9	4.3	56.3	55.5-57.3	18
Sucrose DM	February 2012	9	5.9	55.5	54.5-56.3	26

---

## ***Discussion et perspectives***

---



## **1. L'abscission au cours de la maturation**

### **1.1. Méthodologie et évaluation de l'abscission**

Dans l'étude de l'abscission nous avons constaté qu'à l'exception de la variété d'orange Maltaise blonde et de quelques génotypes hybrides de la population clémentinier x mandarinier, les fruits restent majoritairement sur l'arbre et qu'aucune chute massive et brutale ne se produit ni avant, ni après, la maturité commerciale. L'abscission des fruits en Corse est très étalée dans le temps et n'occasionne pas de perte de récolte. Contrairement à ce qui était attendu, la Force de Détachement du Fruit (FDF) n'a pas diminué au cours de la maturation même chez les fruits dont la maturité était dépassée. Ceci suggère que l'abscission ne se produit pas selon un ordre séquentiel et ne dépend pas de la maturité physiologique et/ou commerciale dans le contexte environnemental de la Corse. La Corse est une région très proche de la limite nord de l'aire de culture des agrumes en Méditerranée, donc avec des conditions différentes des habitats naturels dans l'aire d'origine des agrumes (Ollitrault et Luro, 1997). Cependant, notre étude ne concerne que quelques variétés cultivées (ou hybrides entre variétés cultivées) qui ont été sélectionnées pour leur adaptation à certaines conditions de culture. Elles ne sont pas forcément représentatives du comportement de l'ensemble des variétés et espèces. On ne peut donc pas soutenir l'idée que l'environnement de la Corse ne permet pas l'abscission des agrumes car, nous avons remarqué qu'en collection, les fruits de certaines variétés chutaient abondamment sur une courte période, notamment en hiver (F. Luro communication personnelle).

La FDF est le paramètre le plus utilisé pour suivre l'évolution de l'abscission au cours du temps. Toutefois, ce n'est pas tant la valeur absolue de la FDF qui est informative du déroulement de l'abscission, mais plutôt la vitesse de diminution de ses valeurs jusqu'à des niveaux inférieurs à 10 N. Dans notre situation les valeurs moyennes de FDF sont relativement faibles comparativement à l'Espagne et la Tunisie, mais avec une très forte variation intra-arbre qui ne permet pas la mise en évidence d'une quelconque décroissance dans le temps. Cette variabilité intra arbre de la FDF n'a jamais été signalée, au contraire de faibles et significatives variations au cours de la journée ont été observées sur oranges (Pozo *et al.*, 2007). Le comptage périodique de tous les fruits qui ont chuté pourrait être un autre moyen d'évaluer le phénomène d'abscission. Cette méthode n'a pas été adoptée car nous voulions étudier la phase antérieure à la chute c'est-à-dire la mise en place de ce processus à travers la diminution de la résistance d'attachement du fruit au calice.

## **1.2. Comment l'environnement influence-t-il l'abscission ?**

### **1.2.1. L'abscission des fruits est-elle due à l'évolution des paramètres des fruits au cours de la maturation ?**

#### **Effet de l'environnement sur la maturation**

Comme il était attendu, les fruits produits sur les trois sites présentent des différences significatives au niveau des paramètres du fruit à savoir le poids, la fermeté, le pourcentage du jus, la couleur de la peau, l'acidité et la TSS. L'implication de l'environnement dans la maturation et dans la modulation de la qualité des fruits a été décrite dans plusieurs études (Sinclair et Bartholomew, 1944 ; Reuther *et al.*, 1973 ; Dhuique-Mayer *et al.*, 2009). Les oranges produites en Corse sont plus grosses que celles produites en Tunisie pour la plupart des orangers. Ces résultats sont en contradiction avec les résultats de Marsh *et al.* (1999) qui montrent l'existence d'une corrélation positive entre le poids du fruit et la température dans la mesure où des températures importantes favoriseraient le transport des carbohydrates et l'augmentation *in fine* de la masse et de la taille du fruit.

Les variétés cultivées en Tunisie et en Corse ne sont pas greffées sur le même porte-greffe car les caractéristiques physico-chimiques des sols imposent des choix de porte-greffe adaptés. Ces différences de taille et de poids du fruit peuvent-elles être dues au porte-greffe. L'influence du porte-greffe sur les caractères physico-chimiques des fruits est connue (Castle, 1995 ; Cantuarias-Aviles *et al.*, 2010). Toutefois, dans la mesure où les variétés étudiées en Corse et en Espagne étaient cultivées sur le même porte-greffe, le citrange Carrizo, et que néanmoins les différences de masse de fruit étaient très marquées, ces différences ne peuvent donc pas résulter uniquement de l'effet du porte-greffe, mais peut-être de son interaction avec le type de sol.

Les fruits en Tunisie présentent des acidités les plus faibles contrairement aux fruits produits en Corse. Les températures élevées favorisent la conversion des carbohydrates en sucres au dépend des acides organiques, ce qui se traduit par une diminution de l'acidité (Utsunomiya *et al.*, 1982 ; Richardson *et al.*, 1997). Les fruits les plus sucrés ont été mesurés en Espagne. La teneur en sucres dépend de la température et de la radiation solaire qui influencent la photosynthèse et par conséquent élève les teneurs en sucres (Bain, 1949; Kimball et Box, 1984). Les résultats de notre étude, confirment cette observation. Les différences de température se répercutent aussi sur la vitesse de maturation. La vitesse de maturation des fruits est fortement dépendante des degré-jours accumulés (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996 ;

Richardson *et al.*, 1997; Stenzel *et al.*, 2006). Ceci explique donc pourquoi la maturité des oranges produites en Tunisie, est atteinte bien avant (environ deux mois) celles des oranges cultivées en Espagne et en Corse.

### **Effet de la maturation sur l'abscission**

La variabilité des principaux paramètres de la qualité évoluant au cours de la maturation, observée sur les trois sites, n'a pas pu expliquer les différences observées de la FDF. Les résultats de cette étude ne sont pas en accord avec les résultats obtenus par Tadeo *et al.* (2007). Dans cette étude, la FDF de l'oranger Washington navel diminue fortement parallèlement à une brusque augmentation de la concentration en sucres. Toutefois, dans l'étude multi-sites que nous avons réalisée, les valeurs de TSS mesurées en Espagne restent constantes pour cette variété tandis qu'une chute concomitante des valeurs de FDF est observée. Ce résultat contradictoire montre que la corrélation entre l'abscission et la maturation n'est pas toujours vérifiée en Espagne.

#### ***1.2.2. L'abscission des fruits est-elle due à l'effet direct de l'environnement ?***

Notre étude multi site a mis en exergue l'effet de l'environnement sur l'abscission traduit par l'évolution différente de la FDF sur les trois sites. Cet effet environnemental a été précédemment mentionné sans préciser les facteurs (Addicott, 1982). Notre étude a montré que le porte-greffe, le vent, la pluviométrie, les degré-jours et la radiation solaire ne sont pas impliqués dans le déclenchement du processus d'abscission massif. Le degré-jour est souvent utilisé pour estimer la maturité des fruits (Reuther *et al.*, 1973; Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996) mais ne semble pas avoir d'effet sur l'abscission malgré les différences notées entre les trois sites.

Si les températures supérieures à 13°C favorisent la croissance végétative, les températures inférieures à 13°C (zéro végétatif des agrumes) entraînent le ralentissement ou l'arrêt du développement végétatif des différents organes (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996). Etant donné que la Corse se situe à la limite nord de la zone de production des agrumes, elle a des températures plus faibles qu'en Espagne et en Tunisie. En Corse, le nombre de jours à température moyenne inférieure à 13°C reste élevé jusqu'au mois d'avril. Contrairement à la Corse, la chute des fruits en Tunisie et en Espagne coïncide avec l'augmentation rapide du nombre de jours à température moyenne supérieure à 13°C (de 5 jours en janvier on passe à 25 jours en février). Cette augmentation de température favoriserait la reprise végétative caractérisée par une augmentation forte de la force puits dans les méristèmes donc une

mobilisation des ressources en carbohydrates. A ce stade critique de maturation des fruits, une déficience en carbohydrates peut entraîner une chute des fruits (Bustan et Goldschmidt, 1998). On peut donc supposer l'existence d'une relation indirecte entre l'augmentation de la température et la chute du fruit.

En Corse, l'augmentation du nombre de jours à température moyenne supérieure à 13°C se produit au mois d'avril mais n'est pour autant pas suivie d'une chute massive de fruits. Cela suggère l'implication d'autres facteurs. Plusieurs études ont montré le rôle crucial des hormones dans la régulation de l'abscission (Tadeo *et al.*, 2008). Cette augmentation des températures en Corse coïncide avec la floraison (avril). A ce stade les teneurs en gibbérellines et en auxines connues par leur rôle inhibiteur d'abscission sont très élevées (Crane, 1969; Goldschmidt, 1976; Hofman, 1990) et pourraient expliquer pourquoi les fruits ne chutent pas. Il est à noter qu'en Tunisie et en Espagne les fruits chutent avant la floraison. Notre hypothèse est en accord avec les études conduites sur l'action des produits de synthèse chimique favorisant l'abscission des fruits, utilisés lors de la récolte, qui diminue quand l'application est faite pendant la floraison et la nouaison (Yuan *et al.* (2001); Yuan *et al.* (2003)). L'augmentation des teneurs en auxines et la diminution des teneurs en acide abscissique au cours de cette phase empêchent les fruits de répondre au traitement d'abscission.

Pour compléter ce travail et vérifier les hypothèses proposées, il faudrait mener une étude comparative entre un essai sous conditions contrôlées et un essai au champ qui servirait de témoin. Dans l'essai réalisé sous conditions contrôlées, une augmentation nette de la température à la fin d'hiver serait réalisée en transférant l'arbre en pot sous serre chauffée. Il serait alors possible de vérifier si l'abscission des fruits est induite dans ces conditions. De même pour vérifier si cela repose sur une mobilisation des ressources carbonées et donc une diminution de leur disponibilité pour les fruits, on pourrait simuler cette déficience par la rupture de la conduction phloémienne en réalisant des annélations aux mois de février-mars pour isoler les fruits des organes producteurs (feuilles).

Nos résultats suggèrent que la chute des fruits au cours de la maturation pourrait être liée aux balances hormonales au niveau de la zone d'abscission (ZA-C) du calice. Pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire d'effectuer des dosages hormonaux comme l'éthylène, les auxines et l'acide abscissique.

Enfin, les polyamines interviennent au cours des phénomènes de maturation et d'abscission (Kumar *et al.*, 1997). Les polyamines possèdent le même précurseur que l'éthylène (Pandey *et al.*, 2000). Chez plusieurs espèces telles que l'olivier (Gomez-Jimenez *et al.*, 2010) et le mangouier (Malik et Singh, 2003), des concentrations élevées de polyamines inhibent la synthèse d'éthylène et retardent l'abscission. Par ailleurs, il a été démontré que des températures basses favorisent la synthèse des polyamines chez les agrumes (Kushad et Yelenosky, 1987). On peut donc supposer l'existence d'un lien entre le maintien de températures basses, la synthèse de polyamines et une inhibition de l'action de l'éthylène conduisant à une absence d'abscission. Il serait donc intéressant de réaliser des dosages de polyamines pour confirmer ou rejeter cette hypothèse.

## ***2. Contrôle génétique de l'abscission et des principaux caractères du fruit à différentes dates au cours de la phase de maturation***

### ***2.1. Cartes génétiques***

Nous avons réalisé une carte consensus à l'aide de marqueurs microsatellites et SNP. Cette carte créée à partir d'une population d'hybrides issue d'un backcross clémentinier × mandarinier couvre 871.6 cM et comporte 10 groupes de liaison. Il a été démontré que la distorsion des marqueurs peut entraîner un biais dans la construction de la carte génétique et par conséquent fausser les résultats de l'analyse des QTL (Diouf et Mergeai, 2012). Cependant, dans notre étude, les marqueurs à ségrégation distordue n'ont pas affecté l'ordre des marqueurs sur les groupes de liaison. Leur nombre est très limité 11% chez le parent femelle et 14% chez le parent mâle et se localisent pour moitié sur un seul groupe de liaison (GL1). Les marqueurs ayant une ségrégation non mendélienne ont toutefois permis d'augmenter la couverture et la densité des trois cartes génétiques. A l'exception de la carte de référence des agrumes, la majorité des cartes génétiques construites jusqu'à maintenant sont issues de croisements inter génériques (Talon et Gmitter, 2008). Notre carte est ainsi l'une des premières cartes génétiques établies à partir d'une population issue d'un croisement intra-spécifique. Les cartes du mandarinier et du clémentinier ne couvrent qu'environ que 70% de la carte de référence. Elles ne sont donc pas complètes et saturées (Samouelian et Gaudin (2009). La qualité de ces cartes pourrait être encore améliorée en augmentant le nombre de marqueurs surtout dans les régions chromosomiques à faible densité de marqueurs. L'augmentation du nombre de marqueurs sur la carte du mandarinier est nécessaire pour permettre un marquage de proximité des locus contrôlant des caractères hérités du mandarinier. Les nouvelles techniques comme la GBS (« Genotyping By Sequencing ») devraient permettre le

développement rapide de plusieurs milliers de marqueurs SNP et saturer ainsi les deux cartes génétiques parentales.

## **2.2. Variabilité et héritabilité des caractères**

La variabilité observée dans notre descendance est importante pour tous les caractères mesurés. Elle peut s'expliquer en partie par l'hétérozygotie des parents de ce croisement. Le mandarinier et surtout le clémentinier sont connus pour avoir une hétérozygotie élevée (Wu *et al.*, 2014). Le clémentinier est un hybride naturel de mandarinier (*C. deliciosa*) et d'un oranger qui lui-même découlerait d'un croisement entre deux hybrides interspécifiques (mandarinier × pamplemoussier). Quant au mandarinier, les travaux de séquençage des génomes ont permis de découvrir des introgressions dans son génome de fragments chromosomiques de pamplemoussier (Wu *et al.*, 2014). Au cours de la période d'étude, la variabilité reste constante pour la plupart des paramètres et change pour d'autres. Le choix de deux parents qui diffèrent de par leur dates de maturité (novembre pour le clémentinier et janvier pour le mandarinier) et de par leur couleur et leur taux d'acidité peut expliquer le changement de la variabilité au cours de la phase de maturation. Il est à noter que la variabilité des principaux caractères diminue au cours de la période de mesures.

Au cours de notre étude nous avons mis en évidence que les valeurs d'héritabilité sont élevées à l'exception de la force de détachement du fruit. La faible héritabilité pour ce caractère a été observée lors de deux campagnes de fructification successives et rejoint donc la conclusion de notre étude du chapitre I comme quoi l'environnement a un effet important sur l'expression de la FDF.

## **2.3. QTL détectés**

De nombreux QTL contrôlant la FDF et les caractères physico-chimiques des fruits à différents dates de maturation ont été mis en évidence. Le nombre de QTL varie de 1 à 5 par caractère et par date. La plupart de ces QTL possèdent un effet important. En effet, sur les deux années d'étude, certains QTL détectés ont des effets majeurs ( $R^2 \geq 30\%$ ) tels que ceux de l'indice de couleur  $a^*$ , de la forme du fruit, du pH mesurés en 2011/2012 et ceux du diamètre équatorial, du glucose et du fructose mesurés en 2012/2013. Bien que ces QTL expliquent une part importante de la variance, la variance totale n'a pas été entièrement expliquée. Ceci montre que plusieurs autres QTL intervenant dans le contrôle de ces caractères n'ont pas été détectés. Il s'agit probablement de QTL à effet mineur. Selon Collard *et al.* (2005), la détection des QTL mineurs dépend fortement de la taille de la population. Pour détecter ce type de QTL, il faut disposer d'une population constituée d'un nombre

élevé d'hybrides (Tanksley, 1993). D'après Collard *et al.* (2005), le nombre d'hybrides idéal devrait être supérieur à 250 individus mais cela dépend aussi du type de la population (baccross, F2, RILs...) et du caractère étudié. La taille de la population que nous avons étudiée étant beaucoup plus petite (116 individus) pourrait donc expliquer l'absence de détection des QTL à effet faible.

Il est intéressant de mentionner que l'utilisation du BLUP a permis d'augmenter le nombre de QTL détectés. Cette méthode permet de calculer la valeur génétique à partir d'une valeur phénotypique conduisant à une amélioration de la précision de la détection des QTL (Piepho *et al.*, 2008). En revanche, malgré son utilisation très fréquente en génétique quantitative animale (Grossman, 1989), cette approche est encore très peu utilisée chez les plantes à quelques exceptions près comme la pomme (Segura *et al.*, 2009) et la vigne (Doligez *et al.*, 2013).

Les intervalles de confiance de certains QTL sont larges et ne contiennent pas beaucoup de marqueurs. Pour utiliser ces QTL dans nos programmes de sélection, il serait donc nécessaire de réaliser une cartographie plus fine. Selon Darvasi *et al.* (1993), la puissance de détection des QTL est plus importante dans un intervalle de 10 cM que dans un intervalle de 20 cM. Davantage de marqueurs moléculaires doivent donc être positionnés sur les cartes génétiques parentales afin de réduire les intervalles entre les marqueurs, permettant ainsi de localiser de manière plus précise les QTL.

#### ***2.4. Intérêt de l'approche QTL pour l'étude des relations entre caractères et pour l'amélioration***

La co-localisation d'un QTL peut être expliquée par un QTL à effet pléiotrope, s'il y a des relations causales entre les caractères, mais aussi par deux QTL génétiquement liés (de Vienne, 1998; Gardner et Latta, 2007). De telles co-localisations peuvent avoir des répercussions sur l'amélioration génétique : L'allèle au marqueur de QTL peut entraîner l'amélioration d'un des deux caractères comme il peut être aussi défavorable au deuxième caractère et dans ce cas il ne peut pas être utilisé en amélioration (Chen et Lübberstedt, 2010). Si un allèle est favorable pour les deux caractères, cette région présente alors un intérêt pour l'amélioration simultanée des deux caractères. C'est pour cela qu'il est important de considérer l'ensemble des co-localisations de QTL différents caractères. Dans notre étude, le QTL contrôlant la masse du fruit co-localise avec le QTL de l'acidité. Les deux caractères présentent une corrélation négative qui bien que faible est néanmoins intéressante pour la sélection mais dans certaines proportions. En effet pour la production de petits agrumes destinés au marché

du fruit frais on recherche des fruits plutôt acides et d'une masse avoisinant 100 g. Une autre co-localisation intéressante existe entre le fructose, le glucose et le saccharose. En revanche aucune corrélation ne s'est révélée être favorable pour un caractère et défavorable pour le deuxième. Par ailleurs pour certains caractères les variations phénotypiques sont non corrélées et leurs QTL ne co-localisent pas comme c'est le cas pour l'acidité et la TSS. Il semble donc que l'amélioration des caractères de sucrosité et d'acidité peut se faire indépendamment. Nos résultats montrent aussi que certaines co-localisations perdurent. En effet, un même caractère est contrôlé parfois par le même QTL au cours de deux ou trois dates de maturations tels que la forme du fruit, le CCI, l'indice de couleur a\*. Ceci montre que le contrôle génétique de ces caractères se situe dans les mêmes régions chromosomiques au cours de la maturation. En revanche, les QTL de plusieurs autres caractères à savoir le diamètre polaire, la largeur du pédoncule, la masse du fruit et le saccharose, changent de position au cours de la maturation. Plusieurs QTL sont donc probablement impliqués dans le contrôle de ces caractères mais qui interviennent à différents stades de la phase de maturation des fruits.

### **2.5. Stabilité des QTL**

L'identification des régions chromosomiques portant des QTL stables est une première étape vers l'identification de cibles potentielles pour l'amélioration génétique des caractères étudiés (Hospital, 2009). La stabilité des QTL est un critère crucial pour la sélection assistée par marqueur (Hittalmani *et al.*, 2002). Pour cela, certains caractères ont été étudiés sur deux campagnes de production successives. Seuls quelques QTL contrôlant la masse du fruit, le diamètre équatorial et l'acidité, ont été détectés sur les mêmes groupes de liaison au cours des deux campagnes. Plusieurs autres QTL de ces mêmes paramètres ainsi que les QTL de la FDF, la TSS, le pH et le pourcentage de jus n'étaient pas stables. Certains QTL ont été détectés en 2011/2012 et pas en 2012/2013 et vice versa. de Vienne (1998) rapporte que l'environnement peut avoir une incidence importante sur la détection de QTL. Des QTL détectés dans un milieu ne le sont plus dans un autre. Ainsi, l'instabilité des QTL notée dans notre étude est peut-être due à l'effet de l'environnement et probablement à celui de facteurs climatiques variables. Il semble donc que ces caractères sont fortement influencés par les facteurs environnementaux (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996). Il faudrait étudier la stabilité des QTL de la totalité des caractères au cours d'une troisième année de manière à vérifier la stabilité interannuelle. D'autre part, afin de cibler plus finement les régions du génome les moins sensibles aux variations de conditions environnementales et apporter des informations complémentaires sur la pertinence et la stabilité des régions chromosomiques que nous



avons identifiées, il paraîtrait intéressant de réaliser des analyses QTL en diversifiant les populations d'étude, ainsi que les conditions environnementales étudiées (pratiques culturales, température, stress abiotiques...).

### **2.6. *Abscission et maturation***

La synthèse des résultats issus des analyses QTL au cours des deux campagnes 2011/2012 et 2012/2013 montre que les QTL impliqués dans le contrôle de la FDF sont instables. Une telle instabilité est probablement due à la faible héritabilité de ce caractère en lien avec une forte variation intra-arbre. Les résultats de la première partie de ce travail consacrée à l'étude de l'effet environnemental sur l'abscission confirment cette faible héritabilité. En effet, la différence de l'évolution de la FDF entre les trois sites expérimentaux a mis en évidence la forte influence de l'environnement sur ce caractère.

Selon Pozo *et al.* (2007), la FDF est un caractère qui varie dans la journée. Sa fluctuation est dépendante des conditions climatiques journalières notamment la température et l'humidité relative. D'après nos observations, elle est aussi très variable d'un fruit à un autre d'un même arbre sans lien apparent avec la position ou la constitution physico-chimique du fruit. Pour toutes ces raisons les QTL de la FDF ne sont pas stables. Nos résultats ont montré une co-localisation des QTL de la FDF et de la TSS en 2012/2013. Par ailleurs le QTL de la FDF détecté en 2011/2012 est associé au marqueur PKF-M-186 impliqué dans le métabolisme des sucres (Garcia-Lor *et al.*, 2013). Ceci pourrait suggérer qu'il existerait un lien génétique entre la FDF et la TSS. Toutefois, aucune corrélation n'a été détectée entre ces deux caractères sauf d'une part entre la masse du fruit et la FDF et d'autre part entre la masse du fruit et la teneur en sucres (corrélations positives). Par effets associés on aurait donc une FDF plus élevée pour des fruits plus lourds qui seraient aussi plus sucrés. Cela ne corrobore pas l'hypothèse d'une abscission induite par une élévation du taux de sucres (Tadeo *et al.*, 2007). Par ailleurs l'indication d'une abscission en cours par la FDF réside surtout dans la décroissance rapide des valeurs de ce caractère.

## ***Conclusion générale***

---

### ***1. Existe-t-il des relations entre l'environnement, la maturation et l'abscission?***

A notre connaissance, l'étude que nous avons réalisée est l'une des premiers travaux sur agrumes qui s'intéressent à l'effet de l'environnement sur l'abscission au cours de la maturation et à la nature du lien qui pourrait exister entre l'abscission et les paramètres physico-chimiques de la qualité. Les résultats obtenus ont permis d'apporter des nouvelles connaissances sur les deux processus, la maturation des fruits et l'abscission et de donner des nouvelles pistes de recherche. Il en ressort que bien que la chute massive des fruits avant récolte est un problème souvent rencontré dans plusieurs régions productrices d'agrumes dans le bassin méditerranéen, cette problématique ne touche pas tous les pays producteurs.

La cinétique et l'intensité d'abscission dépend fortement des conditions environnementales. En effet, si en Tunisie et en Espagne l'abscission est un phénomène brutal très fréquent, en Corse ce phénomène est moins présent. Ceci se traduit par une évolution différente de la force de détachement du fruit. Ce paramètre diminue progressivement au cours de la maturation des fruits en Tunisie et en Espagne et reste constant en Corse, bien au-delà de la période de maturité commerciale. Bien que plusieurs facteurs environnementaux différencient la Corse, l'Espagne et la Tunisie, presque aucun d'entre eux n'a pu expliquer la différence de l'évolution de la FDF. Le seul qui puisse être à l'origine de la diminution de la FDF est l'augmentation rapide et soudaine de la température au-dessus du seuil de zéro végétatif des agrumes (13°C) en fin d'hiver. Cette augmentation de température favoriserait la reprise de croissance végétative et l'installation d'une concurrence nutritionnelle entre les différents organes de l'arbre entraînant un déficit de carbohydrates et par voie de conséquence, la chute des fruits. Cette chute de fruit ne pourrait pas se produire en Corse car la période de l'augmentation de la température coïnciderait avec la période où l'arbre est insensible aux signaux de déclenchement de l'abscission. Nous supposons qu'à ce stade la balance hormonale empêche la mise en place du processus d'abscission.

A travers cette étude nous avons pu montrer que la maturation et l'abscission sont deux phénomènes indépendants. L'évolution de la FDF ne dépend pas de l'évolution des paramètres physico-chimiques des fruits. Il est à noter que même si l'environnement influe sur ces paramètres du fruit son action sur l'abscission ne s'exprime pas via la maturation.

Pour approfondir cette étude, il est intéressant de refaire la même étude mais dans des conditions contrôlées. Une telle étude permettra de voir l'influence de chacun des facteurs étudiés y compris la température sur l'abscission. En outre, un dosage hormonal est

fortement recommandé pour comprendre le type de signal envoyé par les facteurs externes de l'environnement afin de déclencher l'abscission.

Suite à cette étude, on a conclu que l'abscission évolue indépendamment de l'évolution des métabolites primaires notamment les sucres et les acides organiques.

## ***2. Etude de déterminisme génétique de la FDF et des paramètres physico-chimiques des fruits***

Ce travail a permis d'étudier le contrôle génétique de la FDF et des paramètres physico-chimiques des fruits. Trois cartes génétiques (consensus et parentales) ont été construites à partir d'un total de 645 marqueurs SNP et SSR. La carte génétique du clémentinier présente une grande similarité avec la carte consensus et est plus fournie en marqueurs que celle du mandarinier. Les trois cartes couvrent environ 85% du génome. Il est à noter qu'une bonne macro-synténie a été remarquée entre la carte consensus et la carte de référence des agrumes. Ces trois cartes génétiques ont été utiles pour la localisation des QTL associés à la variance de la FDF et des paramètres physico-chimiques.

Au total 39 et 45 QTL ont été détectés sur deux campagnes successives de production au cours de trois et quatre dates de la phase de maturation. Leur variance totale varie de 12.9% pour l'indice de couleur  $a^*$  en novembre 2011 à 34.8% pour la forme du fruit en janvier 2012. Le nombre de QTL détectés par caractère et par date varie de 1 à 5. Le nombre élevé de QTL révèle la complexité de certains caractères. Nos résultats ont montré que tous les groupes de liaison sont impliqués dans le contrôle des paramètres de la qualité. Dans de nombreux cas, une même région du génome associe plusieurs QTL de différents caractères. Par exemple dans le groupe de liaison 7, les QTL de la masse du fruit, du diamètre équatorial, de l'acidité, de l'acide citrique et du pH mesurés en octobre 2012 se chevauchent suggérant l'existence d'un QTL à effet pleiotropique ou de QTL différents liés génétiquement mais sans effet croisé sur plusieurs caractères. Bien que le métabolisme des sucres et celui de l'acide citrique soient liés biochimiquement, la sucrosité et l'acidité, deux critères majeurs de la qualité, ne sont pas contrôlés par les mêmes régions chromosomiques.

Pour 6 paramètres mesurés en commun entre les deux campagnes, nous avons détecté seulement 3 QTL stables. Il s'agit d'un QTL de la masse du fruit, d'un QTL du diamètre équatorial et d'un QTL d'acidité. Cette instabilité temporelle (sur les deux années mais aussi au cours de la phase de maturité) est probablement due à la conjonction de différents facteurs tels qu'une variation environnementale, une héritabilité des caractères

moins forte qu'on ne le croit et d'un sous-effectif de la population ségrégeante qui limite la détection des QTL à effet faible (< 10%).

Pour une meilleure précision, il est intéressant de rajouter des marqueurs spécifiques à la mandarine et de densifier les régions chromosomiques contenant les QTL mais aussi de refaire l'étude sur d'autres populations et sur plusieurs années. Nous envisageons aussi d'étudier les QTL de la variation dans le temps des caractères (pentes des courbes de cinétique). De plus les approches gènes candidats et de la variation quantitative de leur expression (eQTL) seront abordées pour tenter de décrypter les étapes clés du contrôle des voies métaboliques.

Ces résultats doivent donc être consolidés avant d'envisager l'utilisation de la sélection assistée par marqueur pour l'amélioration de la qualité des fruits chez les agrumes.

## ***Références bibliographiques***

---

- Abrouk M., Murat F., Pont C., *et al.* (2010), Palaeogenomics of plants: synteny-based modelling of extinct ancestors. *Trends in Plant Science*, **15**, 9, pp. 479-487.
- Addicott F. T. (1982). Abscission. Univ of California Press, 369 p.
- Agustí J., Zapater M., Iglesias D. J., *et al.* (2007), Differential expression of putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases and abscisic acid accumulation in water stressed vegetative and reproductive tissues of citrus. *Plant Science*, **172**, 1, pp. 85-94.
- Agusti M. (2000). Citricultura. 422 p.
- Ahmad R., Struss D., Southwick S. M. (2003), Development and Characterization of Microsatellite Markers in Citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **128**, 4, pp. 584-590.
- Albertini M.-V., Carcouet E., Pailly O., *et al.* (2006), Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 21, pp. 8335-8339.
- Alexander L., Grierson D. (2002), Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of experimental botany*, **53**, 377, pp. 2039-2055.
- Aleza P., Cuenca J., Hernández M., *et al.* (2015), Genetic mapping of centromeres in the nine Citrus clementina chromosomes using half-tetrad analysis and recombination patterns in unreduced and haploid gametes. *BMC plant biology*, **15**, 1, pp. 80.
- Ali Z. M., Armugam S., Lazan H. (1995),  $\beta$ -Galactosidase and its significance in ripening mango fruit. *Phytochemistry*, **38**, 5, pp. 1109-1114.
- Alquézar B., Zacarías L., Rodrigo M. J. (2009), Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene  $\beta$ -cyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. *Journal of experimental botany*, **60**, 6, pp. 1783-1797.
- Asins M., Bernet G., Ruiz C., *et al.* (2004), QTL analysis of citrus tristeza virus-citradia interaction. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**, 4, pp. 603-611.
- Bain F. (1949), Citrus and climate. *The California Citrograph, Los Angeles*, **34**, 9, pp. 382.
- Bain J. M. (1958), Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, Citrus sinensis (L) Osbeck. *Australian Journal of Botany*, **6**, 1, pp. 1-23.
- Barkley N. A., Roose M. L., Krueger R. R., *et al.* (2006), Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, 8, pp. 1519-1531.
- Barrett H., Rhodes A. (1976), A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Systematic Botany*, pp. 105-136.
- Barry C. S., Giovannoni J. J. (2007), Ethylene and fruit ripening. *Journal of plant growth regulation*, **26**, 2, pp. 143-159.

- Barry G. H., van Wyk A. A. (2006), Low-temperature cold shock may induce rind colour development of 'Nules Clementine' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit. *Postharvest biology and technology*, **40**, 1, pp. 82-88.
- Bean R. (1960), Carbohydrate metabolism of citrus fruits. I. Mechanisms of sucrose synthesis in oranges and lemons. *Plant Physiology*, **35**, 4, pp. 429.
- Beavis W. D. (1998), QTL analyses: power, precision, and accuracy. *Molecular dissection of complex traits*, **1998**, pp. 145-162.
- Bernet G., Fernandez-Ribacoba J., Carbonell E., *et al.* (2010), Comparative genome-wide segregation analysis and map construction using a reciprocal cross design to facilitate citrus germplasm utilization. *Molecular breeding*, **25**, 4, pp. 659-673.
- Beuzen N., Stear M., Chang K. (2000), Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*, **160**, 1, pp. 42-52.
- Blanke M. M., Bower J. P. (1991), Small fruit problem in Citrus trees. *Trees*, **5**, 4, pp. 239-243.
- Bleecker A. B. (1998), The ethylene-receptor family from Arabidopsis: structure and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **353**, 1374, pp. 1405-1412.
- Bleecker A. B., Schaller G. E. (1996), The mechanism of ethylene perception. *Plant Physiology*, **111**, 3, pp. 653-660.
- Bonghi C., Tonutti P., Ramina A. (2000), Biochemical and molecular aspects of fruitlet abscission. *Plant Growth Regulation*, **31**, 1-2, pp. 35-42.
- Borisjuk L., Walenta S., Rolletschek H., *et al.* (2002), Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *The Plant Journal*, **29**, 4, pp. 521-530.
- Bouzayen M. (2002), Biology and Biotechnology of the plant hormone ethylene II. pp. 105.
- Brown K. M. (1997), Ethylene and abscission. *Physiologia Plantarum*, **100**, 3, pp. 567-576.
- Brune A., Gonzalez P., Goren R., *et al.* (1998), Citrate uptake into tonoplast vesicles from acid lime (*Citrus aurantifolia*) juice cells. *The Journal of membrane biology*, **166**, 3, pp. 197-203.
- Burns J. (1998). Abscission in citrus fruit, leaves and flowers: physiology, molecular biology and possible points of control. *Proceeding of the citrus abscission workshop, Citrus Research and Education Center, Lake Alfred*, pp. 28-36.
- Burns J. K. (1998). Citrus Fruit Abscission. Citrus research and education center. pp. 130-136.
- Burns J. K., Baldwin E. A. (1994), Glycosidase activities in grapefruit flavedo, albedo and juice vesicles during maturation and senescence. *Physiologia Plantarum*, **90**, 1, pp. 37-44.
- Burns J. K., Buker R. S., Roka F. M. (2005), Mechanical harvesting capacity in sweet orange is increased with an abscission agent. *HortTechnology*, **15**, 4, pp. 758-765.



- Bustan A., Erner Y., Goldschmidt E. (1995), Interactions between developing citrus fruits and their supportive vascular system. *Annals of Botany*, **76**, 6, pp. 657-666.
- Bustan A., Goldschmidt E. (1998), Estimating the cost of flowering in a grapefruit tree. *Plant, cell & environment*, **21**, 2, pp. 217-224.
- Cancel J. D., Larsen P. B. (2002), Loss-of-Function Mutations in the Ethylene Receptor ETR1 Cause Enhanced Sensitivity and Exaggerated Response to Ethylene in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **129**, 4, pp. 1557-1567.
- Canny M., Nairn B., Harvey M. (1968), The velocity of translocation in trees. *Australian Journal of Botany*, **16**, 3, pp. 479-485.
- Cantuarias-Aviles T., Mourão Filho F. d. A. A., Stuchi E. S., *et al.* (2010), Tree performance and fruit yield and quality of 'Okitsu' Satsuma mandarin grafted on 12 rootstocks. *Scientia horticulturae*, **123**, 3, pp. 318-322.
- Castle W. S. (1995), Rootstock as a fruit quality factor in citrus and deciduous tree crops. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, **23**, 4, pp. 383-394.
- Castro P., Rubio J., Cabrera A., *et al.* (2011), A segregation distortion locus located on linkage group 4 of the chickpea genetic map. *Euphytica*, **179**, 3, pp. 515-523.
- Causse M., Saliba-Colombani V., Lesschaeve I., *et al.* (2001), Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theoretical and Applied Genetics*, **102**, 2-3, pp. 273-283.
- Cercós M., Soler G., Iglesias D. J., *et al.* (2006), Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. *Plant molecular biology*, **62**, 4-5, pp. 513-527.
- Chaim A. B., Paran I., Grube R., *et al.* (2001), QTL mapping of fruit-related traits in pepper (*Capsicum annuum*). *Theoretical and Applied Genetics*, **102**, 6-7, pp. 1016-1028.
- Chalh A. (2012). Modèle animal additif plus dominance Nouvelles méthodes d'estimation: Etude sur populations non consanguines simulées. Éditions Universitaires Européennes, 240 p.
- Chang C., Kwok S. F., Bleecker A. B., *et al.* (1993), Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*, **262**, 5133, pp. 539-544.
- Chang Y., Sun R., Sun H., *et al.* (2014), Mapping of quantitative trait loci corroborates independent genetic control of apple size and shape. *Scientia horticulturae*, **174**, pp. 126-132.
- Charmet G. (2000), Power and accuracy of QTL detection: simulation studies of one-QTL models. *Agronomie*, **20**, 3, pp. 309-323.
- Chelong I.-a., Sdoodee S. (2013), Effect of Climate Variability and Degree-Day on Development, Yield and Quality of Shogun (*Citrus reticulata* Blanco) in Southern Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, **47**, pp. 333-341.
- Chen C., Bowman K. D., Choi Y. A., *et al.* (2008), EST-SSR genetic maps for *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes*, **4**, 1, pp. 1-10.

- Chen Y., Lübberstedt T. (2010), Molecular basis of trait correlations. *Trends in Plant Science*, **15**, 8, pp. 454-461.
- Churchill G. A., Doerge R. W. (1994), Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, **138**, 3, pp. 963-971.
- CIE (1986). Colorimetry. Central Bureau de la commission Internationale de l'Eclairage Vienne. pp. 1-83.
- Clements R. L. (1964), Organic Acids in Citrus Fruits. I. Varietal Differences. *Journal of Food Science*, **29**, 3, pp. 276-280.
- Colclasure G. C., Yopp J. H. (1976), Galactose - induced Ethylene Evolution in Mung Bean Hypocotyls: A Possible Mechanism for Galactose Retardation of Plant Growth. *Physiologia Plantarum*, **37**, 4, pp. 298-302.
- Collard B., Jahufer M., Brouwer J., *et al.* (2005), An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, **142**, 1-2, pp. 169-196.
- Cooper W., Henry W. (1968). Field trials with potential abscission chemicals as an aid to mechanical harvesting of citrus in Florida. *Proc. Fla. State Hort. Soc*, pp. 62-68.
- Cooper W. C., Henry W. H. (1973), Chemical control of fruit abscission. *Shedding of Plant Parts*, pp. 476-524.
- Council N. R. (2010). Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening Disease. National Academies Press, 328p.
- Crane J. C. (1969), The role of hormones in fruit set and development. *HortScience*, **4**, 2, pp. 1969-1970.
- Cunningham Jr F., Gantt E. (1998), Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, **49**, 1, pp. 557-583.
- Curk F., Ancillo G., Garcia-Lor A., *et al.* (2014), Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in Citrus species: analysis of chromosome 2. *BMC genetics*, **15**, 1, pp. 152.
- Curk F., Ancillo G., Ollitrault F. *et al.* (2015), Nuclear Species-Diagnostic SNP Markers Mined from 454 Amplicon Sequencing Reveal Admixture Genomic Structure of Modern Citrus Varieties. *PloS One*, 10, 5, 25 p.
- Curl A., Bailey G. (1956), Orange Carotenoids, Part I-Comparison of Carotenoids of Valencia Orange Peel and Pulp, Part II-Carotenoids Aged Canned Valencia Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **4**, 2, pp. 156-162.
- Daito H., Sato Y. (1985), Changes in the sugar and organic acid components of satsuma mandarin fruit during maturation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*, pp. 155-162.
- Dal Cin V., Barbaro E., Danesin M., *et al.* (2009), Fruitlet abscission: A cDNA-AFLP approach to study genes differentially expressed during shedding of immature fruits reveals the involvement of a putative auxin hydrogen symporter in apple (*Malus domestica* L. Borkh). *Gene*, **442**, 1, pp. 26-36.

- Dalkilic Z., Timmer L., Gmitter F. G. (2005), Linkage of an *Alternaria* disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **130**, 2, pp. 191-195.
- Darvasi A., Weinreb A., Minke V., *et al.* (1993), Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics*, **134**, 3, pp. 943-951.
- Davies F., Albrigo L. G. (1994), Citrus. CAB International. *Wallingford, UK*, pp. 30-33.
- Davis K., Stover E., Wirth F. (2004), Economics of fruit thinning: A review focusing on apple and citrus. *HortTechnology*, **14**, 2, pp. 282-289.
- de Moraes A. P., dos Santos Soares Filho W., Guerra M. (2007), Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Research*, **15**, 1, pp. 115-121.
- de Oliveira A. C., Bastianel M., Cristofani-Yaly M., *et al.* (2007), Development of genetic maps of the citrus varieties 'Murcott'tangor and 'Pêra'sweet orange by using fluorescent AFLP markers. *Journal of applied genetics*, **48**, 3, pp. 219-231.
- De Rocca Serra D., Ollitrault P. (1992). Les ressources génétiques chez les agrumes. *Fruits*, 47, pp. 115-123.
- de Vienne D. (1998). Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Editions Quae, 200 p.
- Del Río J. A., Arcas M. C., Benavente O., *et al.* (1998), Changes of polymethoxylated flavones levels during development of *Citrus aurantium* (cv. sevellano) fruits. *Planta medica*, **64**, 06, pp. 575-576.
- Del Río J. A., Arcas M. C., Benavente O., *et al.* (1998), Changes of Polymethoxylated Flavones Levels during Development of *Citrus aurantium* (cv. Sevellano) fruits. *Planta medica*, **64**, 06, pp. 575-576.
- Deng Z., Gentile A., Nicolosi E., *et al.* (1996). Parentage determination of some citrus hybrids by molecular markers. *Proc Int Soc Citricul*, pp. 849-854.
- Dhuique-Mayer C., Fanciullino A.-L., Dubois C., *et al.* (2009), Effect of genotype and environment on citrus juice carotenoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 19, pp. 9160-9168.
- Diouf F. B. H., Mergeai G. (2012), Distorsions de ségrégation et amélioration génétique des plantes (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **16**, 4, pp. 499-508.
- Doligez A., Bertrand Y., Farnos M., *et al.* (2013), New stable QTLs for berry weight do not colocalize with QTLs for seed traits in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC plant biology*, **13**, 1, pp. 217.
- Doyle J., Doyle J. (1987), A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, pp. 11-15.
- Durham R., Liou P., Gmitter Jr F., *et al.* (1992), Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus. *Theoretical and Applied Genetics*, **84**, 1-2, pp. 39-48.

- Echeverria E., Burns J. K. (1989), Vacuolar acid hydrolysis as a physiological mechanism for sucrose breakdown. *Plant Physiology*, **90**, 2, pp. 530-533.
- Echeverria E. E. (1996), Sugar, acid accumulation and metabolism. *Citrus Flowering and Fruiting Short Course, CREC, Lake Alfred, FL*, pp. 100-107.
- Echt C., Knapp S., Liu B. (1992), Genome mapping with non-inbred crosses using GMendel 2.0. *Maize Genet. Coop. Newsl*, **66**, pp. 27-29.
- Eduardo I., Pacheco I., Chietera G., *et al.* (2011), QTL analysis of fruit quality traits in two peach intraspecific populations and importance of maturity date pleiotropic effect. *Tree Genetics & Genomes*, **7**, 2, pp. 323-335.
- El-Otmani M., Agustí M., Aznar M., *et al.* (1993), Improving the size of 'Fortune' mandarin fruits by the auxin 2, 4-DP. *Scientia horticultrae*, **55**, 3, pp. 283-290.
- Emmerlich V., Linka N., Reinhold T., *et al.* (2003), The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 19, pp. 11122-11126.
- Estornell L. H., Agustí J., Merelo P., *et al.* (2013), Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Science*, **199**, pp. 48-60.
- Etienne A., Génard M., Lobit P., *et al.* (2013), What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of experimental botany*, **64**, 6, pp. 1451-1469.
- Fanciullino A.-L., Dhuique-Mayer C., Froelicher Y., *et al.* (2008), Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 10, pp. 3628-3638.
- Fanciullino A.-L., Dhuique-Mayer C., Luro F., *et al.* (2006), Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 12, pp. 4397-4406.
- Fang D., Roose M. (1997), Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 3, pp. 408-417.
- FAO. 2014. FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- Ferguson L., Grafton-Cardwell, Elliot E. (2014). Citrus Production Manual. UCANR Publications, 433 p.
- Ferrarese L., Moretto P., Trainotti L., *et al.* (1996), Cellulase involvement in the abscission of peach and pepper leaves is affected by salicylic acid. *Journal of experimental botany*, **47**, 2, pp. 251-257.
- Frémont T. (1935), Etude sur quelques caractères botaniques et agronomiques du genre Citrus. *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, **15**, 164, pp. 235-242.
- Froelicher Y., Dambier D., Bassene J., *et al.* (2008), Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Resources*, **8**, 1, pp. 119-122.

- Frost H. B., Soost R. K. (1968). Seed reproduction: development of gametes and embryos. *In: The citrus industry. Reuther W., Batchelor H. J., Batchelor L. D. eds.*, Univ. of California Press, Berkeley, vol. 1, pp. 290-324.
- Fujii H., Shimada T., Sugiyama A., *et al.* (2007), Profiling ethylene-responsive genes in mature mandarin fruit using a citrus 22K oligoarray. *Plant Science*, **173**, 3, pp. 340-348.
- Füzfai Z., Molnár-Perl I. (2007), Gas chromatographic–mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: Analysis of flavonoids, sugars, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits. *Journal of Chromatography A*, **1149**, 1, pp. 88-101.
- Garcia-Lor A., Curk F., Snoussi-Trifa H., *et al.* (2013), A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *Annals of Botany*, **111**, 1, pp. 1-19.
- García-Lor A., Luro F., Navarro L., *et al.* (2012), Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: a perspective for genetic association studies. *Molecular genetics and genomics*, **287**, 1, pp. 77-94.
- Garcia M., Asins M., Carbonell E. (2000), QTL analysis of yield and seed number in Citrus. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, 3, pp. 487-493.
- Garcias - Luis A., Oliveira M., Bordón Y., *et al.* (2002), Dry matter accumulation in citrus fruit is not limited by transport capacity of the pedicel. *Annals of Botany*, **90**, 6, pp. 755-764.
- Gardner K. M., Latta R. G. (2007), Shared quantitative trait loci underlying the genetic correlation between continuous traits. *Molecular ecology*, **16**, 20, pp. 4195-4209.
- Geldermann H. (1975), Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **46**, 7, pp. 319-330.
- Givan C. V. (1999), Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biological Reviews*, **74**, 3, pp. 277-309.
- Godfrey-Sam-Aggrey W. (1973), A preliminary evaluation of effects of environment and rootstock types on fruit quality of sweet orange cultivars in Ghana. II: Internal quality and maturity standards. *Ghana journal of agricultural science*, pp. 75-85.
- Goldschmidt E. (1976), Endogenous growth substances of Citrus tissues. *HortScience*, **11**, pp. 95-99.
- Gómez-Cadenas A., Mehouchi J., Tadeo F. R., *et al.* (2000), Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus. *Planta*, **210**, 4, pp. 636-643.
- Gomez-Jimenez M. C., Paredes M. A., Gallardo M., *et al.* (2010), Mature fruit abscission is associated with up-regulation of polyamine metabolism in the olive abscission zone. *Journal of plant physiology*, **167**, 17, pp. 1432-1441.
- Gomez L., Bancel D., Rubio E., *et al.* (2007), The microplate reader: an efficient tool for the separate enzymatic analysis of sugars in plant tissues—validation of a micro - method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**, 10, pp. 1893-1905.

- Goren R. (1993), Anatomical, physiological, and hormonal aspects of abscission in citrus. *Hort. Rev.* **15**, pp. 145-182.
- Goren R., Goldschmidt E. (1970), Regulative Systems in the Developing Citrus Fruit I. The Hormonal Balance in Orange Fruit Tissues. *Physiologia Plantarum*, **23**, 5, pp. 937-947.
- Goren R., Huberman M. (1976), Effects of Ethylene and 2, 4 - D on the Activity of Cellulase Isoenzymes in Abscission Zones of the Developing Orange Fruit. *Physiologia Plantarum*, **37**, 2, pp. 123-130.
- Gross J. (1987). Pigments in fruits. Academic Press London, 313 p.
- Grossman R. F. M. (1989), unbiased prediction. pp. 467-477.
- Gulsen O., Uzun A., Canan I., *et al.* (2010), A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. *Euphytica*, **173**, 2, pp. 265-277.
- Gupta P., Balyan H., Edwards K., *et al.* (2002), Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **105**, 2-3, pp. 413-422.
- Hackett C., Broadfoot L. (2003), Effects of genotyping errors, missing values and segregation distortion in molecular marker data on the construction of linkage maps. *Heredity*, **90**, 1, pp. 33-38.
- Haldane J. B. S. (1919), The combination of linkage values and the calculation of distance between linked factors. *J.Genet.*, **8**, pp. 299-309.
- Haley C. S., Andersson L. (1997), Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals. *Genome mapping: a practical approach*, pp. 49-71.
- Hall A. E., Findell J. L., Schaller G. E., *et al.* (2000), Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **123**, 4, pp. 1449-1458.
- Hayes P., Liu B., Knapp S., *et al.* (1993), Quantitative trait locus effects and environmental interaction in a sample of North American barley germ plasm. *Theoretical and Applied Genetics*, **87**, 3, pp. 392-401.
- Henderson C. (1974), General flexibility of linear model techniques for sire evaluation. *Journal of Dairy Science*, **57**, 8, pp. 963-972.
- Henderson C. R. (1963), Selection index and expected genetic advance. *Statistical genetics and plant breeding*, **982**, pp. 141-163.
- Henderson C. R., Kempthorne O., Searle S. R., *et al.* (1959), The estimation of environmental and genetic trends from records subject to culling. *Biometrics*, **15**, 2, pp. 192-218.
- Hendrickson R., Kesterson J. (1964). Hesperidin in Florida oranges. University of Florida Agricultural Experiment Station, 42 p.
- Hensz R. (1971), Star Ruby, a new deep-red-fleshed grapefruit variety with distinct tree characteristics. *Rio Grande Val Hort Soc J*, pp. 54-58.
- Hensz R. (1977). Mutation breeding and the development of the 'Star Ruby' grapefruit. *Proc. Intl. Soc. Citriculture*, pp. 582-585.

- Hirel B., Le Gouis J., Perez P., *et al.* (2004). Le maïs et le blé, céréales modèles pour la recherche en biologie intégrative et son application à la sélection. *In: La génomique en biologie végétale. Morot-Gaudry J. F., Briat J. F. eds.*, pp. 453-471.
- Hittalmani S., Shashidhar H., Bagali P. G., *et al.* (2002), Molecular mapping of quantitative trait loci for plant growth, yield and yield related traits across three diverse locations in a doubled haploid rice population. *Euphytica*, **125**, 2, pp. 207-214.
- Ho L. C. (1988), Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **39**, 1, pp. 355-378.
- Hockema B. R., Echeverria E. (2000). Factors involved in soluble solids accumulation in citrus fruits. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, pp. 126-130.
- Hodgson R. W. (1967). Horticultural varieties of citrus. *In: The citrus industry. Reuther W., Webber H. J., Batchelor L. D. eds.*, Univ. of California Press, Riverside, vol. 1, pp. 431–591.
- Hofman P. J. (1990), Abscisic acid and gibberellins in the fruitlets and leaves of ‘Valencia’ orange in relation to fruit growth and retention. *Scientia horticulturae*, **42**, 3, pp. 257-267.
- Holland N., Sala J., Menezes H., *et al.* (1999), Carbohydrate content and metabolism as related to maturity and chilling sensitivity of cv. fortune mandarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 7, pp. 2513-2518.
- Hommel M. (2007). La régulation transcriptionnelle de l'expression génique dans le fruit de tomate: Caractérisation fonctionnelle de promoteurs fruit-spécifiques et d'un co-facteur de la transcription de type MBF1, 137p.
- Hopkins W. G. (2003). *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur, 532 p.
- Hospital F. (2009), Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica*, **136**, pp. 303-310.
- Huber D. J. (1983), The role of cell wall hydrolases in fruit softening. *Horticultural Reviews, Volume 5*, pp. 169-219.
- Huberman M., Goren R. (1979), Exo - and Endo - Cellular Cellulase and Polygalacturonase in Abscission Zones of Developing Orange Fruits. *Physiologia Plantarum*, **45**, 2, pp. 189-196.
- Hui Y. H., Barta J., Cano P., *et al.* (2008). *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. Wiley, 697 p.
- Hulme A. C. (1971). *The biochemistry of fruits and their products*. 788 p.
- Hyodo H., Nishino T. (1981), Wound-induced ethylene formation in albedo tissue of citrus fruit. *Plant Physiology*, **67**, 3, pp. 421-423.
- Iglesias D. J., Cercós M., Colmenero-Flores J. M., *et al.* (2007), Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **19**, 4, pp. 333-362.

- Jacquemond C., Agostini D. (2013). Connaître l'arbre et son fonctionnement. *In: Les clémentiniers et autres petits agrumes. Jacquemond C., Curk F., Marion H. eds.*, Versailles, France, pp. 165-182.
- Jacquemond C., Curk F., Heuzet M. (2013). Les clémentiniers et autres petits agrumes. Editions Quae, 363 p.
- Jacquemond C., Curk F., Yann F., *et al.* (2013). Variétés et porte-greffes: création, description et sélection. *In: Les clémentiniers et autres petits agrumes. Jacquemond C., Curk F., Marion H. eds.*, pp. 37-107.
- Jansen R. (1993), Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. *Biometrics*, pp. 227-231.
- Jansen R. C. (1994), Controlling the type I and type II errors in mapping quantitative trait loci. *Genetics*, **138**, 3, pp. 871-881.
- Jiménez-Cuesta M., Cuquerella J., Martínez-Javaga J. (1982). Determination of a color index for citrus fruit degreening. *Proceedings of the International Society of Citriculture/[International Citrus Congress, Tokyo, Japan, November 9-12, 1981]*, pp. 750-753.
- John-Karuppiyah K.-J., Burns J. K. (2010), Expression of ethylene biosynthesis and signaling genes during differential abscission responses of sweet orange leaves and mature fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **135**, 5, pp. 456-464.
- Joseph Nairn C., Lewandowski D. J., Burns J. K. (1998), Genetics and expression of two pectinesterase genes in Valencia orange. *Physiologia Plantarum*, **102**, 2, pp. 226-235.
- Kader A. A. (1997). Fruit maturity, ripening, and quality relationships. *International Symposium Effect of Pre- & Postharvest factors in Fruit Storage 485*, pp. 203-208.
- Kanellis A. (1999). Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II. *proceedings of the EU-TMR-Euroconference Symposium on Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene II*, Thira (Santorini), Greece, pp. 5-8
- Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., *et al.* (2004), Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology*, **134**, 2, pp. 824-837.
- Katz E., Boo K. H., Kim H. Y., *et al.* (2011), Label-free shotgun proteomics and metabolite analysis reveal a significant metabolic shift during citrus fruit development. *Journal of experimental botany*, **62**, 15, pp. 5367-5384.
- Katz E., Fon M., Lee Y., *et al.* (2007), The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. *Planta*, **226**, 4, pp. 989-1005.
- Katz E., Lagunes P. M., Riov J., *et al.* (2004), Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. *Planta*, **219**, 2, pp. 243-252.
- Kazokas W. C., Burns J. K. (1998), Cellulase activity and gene expression in citrus fruit abscission zones during and after ethylene treatment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **123**, 5, pp. 781-786.



- Kende H. (1993), Ethylene biosynthesis. *Annual review of plant biology*, **44**, 1, pp. 283-307.
- Kijas J., Thomas M., Fowler J., *et al.* (1997), Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theoretical and Applied Genetics*, **94**, 5, pp. 701-706.
- Kimball D. A., Box C. (1984). Factors affecting the rate of maturation of citrus fruits. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, pp. 40-44.
- Kimball D. A., Box C. (1984). Factors affecting the rate of maturation of citrus fruits. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, pp. 40-44.
- Knee M. (2002). Fruit Quality and Its Biological Basis. Sheffield Academic Press, 294 p.
- Koch K. (2004), Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current opinion in plant biology*, **7**, 3, pp. 235-246.
- Koch K. E., Avigne W. T. (1990), Postphloem, nonvascular transfer in citrus kinetics, metabolism, and sugar gradients. *Plant Physiology*, **93**, 4, pp. 1405-1416.
- Koch K. E., Jones P. H., Avigne W. T., *et al.* (1986), Growth, dry matter partitioning, and diurnal activities of RuBP carboxylase in citrus seedlings maintained at two levels of CO<sub>2</sub>. *Physiologia Plantarum*, **67**, 3, pp. 477-484.
- Komatsu A., Moriguchi T., Koyama K., *et al.* (2002), Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *Journal of experimental botany*, **53**, 366, pp. 61-71.
- Kosambi D. (1943), The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics*, **12**, 1, pp. 172-175.
- Kossuth S., Biggs R. (1977). Cellulase isoenzymes in citrus. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, pp. 683-686.
- Kovermann P., Meyer S., Hörtensteiner S., *et al.* (2007), The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *The Plant Journal*, **52**, 6, pp. 1169-1180.
- Krezdorn A. (1970). Citrus cultivars for the tropics. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, pp. 336-341.
- Krug CA, 1943. Chromosome numbers in the subfamily arantioideae, with special reference in the genus Citrus. *Citrus Botanical Gazette*, 104:602-611.
- Ku H.-M., Grandillo S., Tanksley S. (2000), fs8. 1, a major QTL, sets the pattern of tomato carpel shape well before anthesis. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, 5-6, pp. 873-878.
- Kumar A., Taylor M., Altabella T., *et al.* (1997), Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Science*, **2**, 4, pp. 124-130.
- Kushad M. M., Yelenosky G. (1987), Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation of citrus. *Plant Physiology*, **84**, 3, pp. 692-695.
- Ladanyia M. (2008). Citrus fruit: biology, technology and evaluation. Academic press, 542 p.
- Lahey K. A., Yuan R., Burns J. K., *et al.* (2004), Induction of phytohormones and differential gene expression in citrus flowers infected by the fungus *Colletotrichum acutatum*. *Molecular plant-microbe interactions*, **17**, 12, pp. 1394-1401.

- Lander E. S., Botstein D. (1989), Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, **121**, 1, pp. 185-199.
- Lander E. S., Green P., Abrahamson J., *et al.* (1987), MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, **1**, 2, pp. 174-181.
- Lee Y., Derbyshire P., Knox J. P., *et al.* (2008), Sequential cell wall transformations in response to the induction of a pedicel abscission event in *Euphorbia pulcherrima* (poinsettia). *The Plant Journal*, **54**, 6, pp. 993-1003.
- Lewis M. W., Leslie M. E., Liljegren S. J. (2006), Plant separation: 50 ways to leave your mother. *Current opinion in plant biology*, **9**, 1, pp. 59-65.
- Li K.-T., Burns J. K., Syvertsen J. P. (2008), Recovery from phytotoxicity after foliar application of fruit-loosening abscission compounds to citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **133**, 4, pp. 535-541.
- Li W., Yuan R., Burns J. K., *et al.* (2003), Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **128**, 4, pp. 578-583.
- Li X., Quigg R. J., Zhou J., *et al.* (2006), A critical evaluation of the effect of population size and phenotypic measurement on QTL detection and localization using a large F2 murine mapping population. *Genetics and Molecular Biology*, **29**, 1, pp. 166-173.
- Liebhart R., Koller B., Gianfranceschi L., *et al.* (2003), Creating a saturated reference map for the apple (*Malus× domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, **106**, 8, pp. 1497-1508.
- Lobit P., Genard M., Soing P., *et al.* (2006), Modelling malic acid accumulation in fruits: relationships with organic acids, potassium, and temperature. *Journal of experimental botany*, **57**, 6, pp. 1471-1483.
- Lorieux M., Goffinet B., Perrier X., *et al.* (1995), Maximum-likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortion. 1. Backcross populations. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**, 1, pp. 73-80.
- Lowell C. A., Tomlinson P. T., Koch K. E. (1989), Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiology*, **90**, 4, pp. 1394-1402.
- Lu C., Hawkesford M., Barraclough P., *et al.* (2005), Markedly different gene expression in wheat grown with organic or inorganic fertilizer. *Proc Biol Sci*, **272**, 1575, pp. 1901 - 1908.
- Lu H., Romero-Severson J., Bernardo R. (2002), Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, **105**, 4, pp. 622-628.
- Luro F., Gatto J., Costantino G., *et al.* (2011), Analysis of genetic diversity in Citrus. *Plant Genetic Resources*, **9**, 02, pp. 218-221.

- Luro F., Jacquemond C., Curk F. (2013). La clémentine dans la diversité génétique des agrumes. *In: Les clémentiniers et autres petits agrumes. Jacquemond C., Curk F., Heuzet M. eds., Versailles, France, pp. 17-36.*
- Luro F., Lorieux M., Laigret F., *et al.* (1994), Genetic mapping of an intergeneric citrus hybrid using molecular markers. *Fruits*, **49**, 5-6, pp. 483-485.
- Luro F., Lorieux M., Laigret F., *et al.* (1995), Cartographie du génome des agrumes à l'aide des marqueurs moléculaires et distorsions de ségrégation. *COLLOQUES-INRA*, pp. 69-69.
- Luro F., Maddy F., Ollitrault P., *et al.* (2000). Identification of 2n gamete parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid Citrus hybrids. *Proc Int Soc Citric*, pp. 168-169.1).
- Luro F. L., Costantino G., Terol J., *et al.* (2008), Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC genomics*, **9**, 1, pp. 1-13.
- Lynch M., Walsh B. (1998). Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Sunderland, MA, 803 p.
- Mabberley D. J. (1997), A classification for edible Citrus (Rutaceae). *Telopea*, **7**, 2, pp. 167-172.
- Macrae A. R., Moorhouse R. (1970), The oxidation of malate by mitochondria isolated from cauliflower buds. *European Journal of Biochemistry*, **16**, 1, pp. 96-102.
- Mahouachi J., Iglesias D. J., Agustí M., *et al.* (2009), Delay of early fruitlet abscission by branch girdling in citrus coincides with previous increases in carbohydrate and gibberellin concentrations. *Plant Growth Regulation*, **58**, 1, pp. 15-23.
- Malik A., Singh Z. (2003), Abscission of mango fruitlets as influenced by biosynthesis of polyamines. *Journal of horticultural science & biotechnology*, **78**, 5, pp. 721-727.
- MAPM (2013). Note de veille du secteur agrumicole Novembre 2013. pp. 20. Direction de la Stratégie et des Statistiques, Maroc.
- Marsh K., Richardson A., Macrae E. (1999), Early- and mid-season temperature effects on the growth and composition of satsuma mandarins. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **74**, 4, pp. 443-451.
- Martinoia E., Maeshima M., Neuhaus H. E. (2007), Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of experimental botany*, **58**, 1, pp. 83-102.
- Matsumoto H., Ikoma Y., Kato M., *et al.* (2007), Quantification of carotenoids in citrus fruit by LC-MS and comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among citrus varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6, pp. 2356-2368.
- Mehouachi J., Serna D., Zaragoza S., *et al.* (1995), Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of Citrus unshiu. *Plant Science*, **107**, 2, pp. 189-197.
- Meléndez-Martínez A. J., Britton G., Vicario I. M., *et al.* (2007), Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*, **101**, 3, pp. 1145-1150.

- Mesejo C., Gambetta G., Gravina A., *et al.* (2012), Relationship between soil temperature and fruit colour development of 'Clemenpons' Clementine mandarin (*Citrus clementina* Hort ex. Tan). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **92**, 3, pp. 520-525.
- Michelmore R. (2000), Genomic approaches to plant disease resistance. *Current opinion in plant biology*, **3**, 2, pp. 125-131.
- Monforte A., Oliver M., Gonzalo M., *et al.* (2004), Identification of quantitative trait loci involved in fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **108**, 4, pp. 750-758.
- Moobi S. N. a. M. (2013). South africain fruit trade flow: january 2013. pp. 18.
- Morot-Gaudry J.-F., Briat J.-F. (2004). La génomique en biologie végétale. Editions Quae, 582p.
- Morre D. J. (1968), Cell wall dissolution and enzyme secretion during leaf abscission. *Plant Physiology*, **43**, 9 Pt B, pp. 1545-1559.
- Navarro J. M., Pérez-Pérez J. G., Romero P., *et al.* (2010), Analysis of the changes in quality in mandarin fruit, produced by deficit irrigation treatments. *Food Chemistry*, **119**, 4, pp. 1591-1596.
- Nicolosi E., Deng Z., Gentile A., *et al.* (2000), Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**, 8, pp. 1155-1166.
- Niederhuth C. E., Cho S. K., Seitz K., *et al.* (2013), Letting Go is Never Easy: Abscission and Receptor - Like Protein Kinases. *Journal of integrative plant biology*, **55**, 12, pp. 1251-1263.
- Ocampo J. A. (2008). Atlas des produits de base. Uniated Nations Publications, 56 p.
- Oliveira R. P. d., Aguilar-Vildoso C. I., Cristofani M., *et al.* (2004), Skewed RAPD markers in linkage maps of Citrus. *Genetics and Molecular Biology*, **27**, 3, pp. 437-441.
- Ollitrault P., Dambier D., Luro F., *et al.* (1994), Nuclear genome size variations in Citrus. *Fruits*, **49**, 5-6, pp. 475-476.
- Ollitrault P., Dambier D., Luro F., *et al.* (2008), Ploidy manipulation for breeding seedless triploid citrus. *Plant Breeding Reviews, Volume 30*, pp. 323-352.
- Ollitrault P., Jacquemond C., Dubois C., *et al.* (2003), Botany and genetic ressources. *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*, pp. 193.
- Ollitrault P., Jacquemond C., Dubois C., *et al.* (1999), Les agrumes. *Diversité génétique des plantes tropicales cultivées*, pp. 89-111.
- Ollitrault P., Luro F. (1995), Amélioration des agrumes et biotechnologie. *Fruits*, **50**, 4, pp. 267-279.
- Ollitrault P., Luro F. (1997). Les agrumes. *In: Amélioration des plantes tropicales. Charrier A., Jacquot M., Hamon S., Nicolas D. eds.*, CIRAD-Orstom, pp. 623.
- Ollitrault P., Navarro L. (2012). Citrus. *In: Fruit Breeding. Springer*, pp. 623-662.

- Ollitrault P., Terol J., Chen C., *et al.* (2012), A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC genomics*, **13**, 1, pp. 593.
- Ollitrault P., Terol J., Garcia-Lor A., *et al.* (2012), SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC genomics*, **13**, 1, pp. 13.
- Osborne D. J. (1959), Control of leaf senescence by auxins. pp. 1459-1460.
- Pandey S., Ranade S., Nagar P., *et al.* (2000), Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *Journal of biosciences*, **25**, 3, pp. 291-299.
- Pang X.-M., Hu C.-G., Deng X.-X. (2007), Phylogenetic relationships within Citrus and its related genera as inferred from AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **54**, 2, pp. 429-436.
- Paterson A. H., Damon S., Hewitt J. D., *et al.* (1991), Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics*, **127**, 1, pp. 181-197.
- Patterson S. E. (2001), Cutting loose. Abscission and dehiscence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **126**, 2, pp. 494-500.
- Peña L., Martín-Trillo M., Juárez J., *et al.* (2001), Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature biotechnology*, **19**, 3, pp. 263-267.
- Penjor T., Yamamoto M., Uehara M., *et al.* (2013), Phylogenetic relationships of Citrus and its relatives based on matK gene sequences. *PloS one*, **8**, 4, pp. 62574.
- Pérez-Pérez J., Romero P., Navarro J., *et al.* (2008), Response of sweet orange cv 'Lane late' to deficit-irrigation strategy in two rootstocks. II: Flowering, fruit growth, yield and fruit quality. *Irrigation Science*, **26**, 6, pp. 519-529.
- Piepho H., Möhring J., Melchinger A., *et al.* (2008), BLUP for phenotypic selection in plant breeding and variety testing. *Euphytica*, **161**, 1-2, pp. 209-228.
- Pierik R., Abbadi S. (1972), The effect of cytokinins on auxin-induced secondary abscission in isolated apple pedicels. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **68**, 3, pp. 281-282.
- Pozo L., Malladi A., John-Karuppiah K.-J., *et al.* (2007). Daily fluctuation in fruit detachment force of 'Valencia' orange is related to time of day, temperature, relative humidity, fruit weight and juice percentage. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, pp. 41-44.120.
- Pracharoenwattana I., Cornah J. E., Smith S. M. (2007), Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in  $\beta$  - oxidation but not in the glyoxylate cycle. *The Plant Journal*, **50**, 3, pp. 381-390.
- Praloran J. (1971), Citrus. *Les agrumes*. Maisonneuve et Larose, 565p.
- Prinsloo J. A. (2007). Ecophysiological responses of citrus trees and sugar accumulation of fruit in response to altered plant water relations. pp. 92. Stellenbosch: University of Stellenbosch.

- Racsó J., Leite G., Petri J., *et al.* (2007), Fruit drop: The role of inner agents and environmental factors in the drop of flowers and fruits. *International Journal of Horticultural Science*, **13**, 3, pp. 13-23.
- Racsó J., Nagy J., Soltész M., *et al.* (2006), Fruit drop: I. Specific characteristics and varietal properties of fruit drop. *International Journal of Horticultural Science*, **12**, 2, pp. 59-67.
- Racsó J., Soltész M., Szabó Z., *et al.* (2006), Fruit drop: II. Biological background of flower and fruit drop. *Int. J. hort. Sci*, **12**, pp. 103-108.
- Raga V., Bernet G., Carbonell E., *et al.* (2012), Segregation and linkage analyses in two complex populations derived from the citrus rootstock Cleopatra mandarin. Inheritance of seed reproductive traits. *Tree Genetics & Genomes*, **8**, 5, pp. 1061-1071.
- Rasmussen G. K. (1975), Cellulase Activity, Endogenous Abscisic Acid, and Ethylene in Four Citrus Cultivars during Maturation. *Plant Physiology*, **56**, 6, pp. 765-767.
- Ratner A., Goren R., Monselise S. (1969), Activity of pectin esterase and cellulase in the abscission zone of citrus leaf explants. *Plant Physiology*, **44**, 12, pp. 1717-1723.
- Reuther W., Nauer E., Summers L. (1973). Effects of seasonal temperature regimes on development and maturation of citrus fruits. *Proc. Intl. Soc. Citricult*, pp. 63-71.
- Richardson A. C., Marsh K., Macrae E. (1997), Temperature effects on satsuma mandarin fruit development. *Journal of Horticultural Science (United Kingdom)*, pp. 7-12.
- Richardson A. C., Marsh k. b., Rae E. A. M. (2000). Temperature effects on the composition of Satsuma Mandarins in New Zealand. *Proceeding of international society of citriculture*, pp. 303-307.
- Ríos G., Naranjo M. A., Rodrigo M.-J., *et al.* (2010), Identification of a GCC transcription factor responding to fruit colour change events in citrus through the transcriptomic analyses of two mutants. *BMC plant biology*, **10**, 1, pp. 276.
- Roberts J. A., Elliott K. A., Gonzalez-Carranza Z. H. (2002), Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annual review of plant biology*, **53**, 1, pp. 131-158.
- Roberts J. A., Whitelaw C. A., Gonzalez-Carranza Z. H., *et al.* (2000), Cell separation processes in plants—models, mechanisms and manipulation. *Annals of Botany*, **86**, 2, pp. 223-235.
- 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**, 3, pp. 633-643.
- Roka F. M., Burns J. K., Syvertsen J., *et al.* (2009). Improving the economic viability of Florida citrus by enhancing mechanical harvesting with the abscission agent CMNP. pp. 37. University of Florida institute of food and agricultural sciences.
- Roose M. (2007), 12 Mapping and Marker-assisted Selection. *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, pp. 275.

- Roose M. L., Close T. J. (2008). Genomics of citrus, a major fruit crop of tropical and subtropical regions. *In: Genomics of Tropical Crop Plants*. Springer, pp. 187-202.
- Sadka A., Dahan E., Cohen L., *et al.* (2000), Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiologia Plantarum*, **108**, 3, pp. 255-262.
- Saliba-Colombani V., Causse M., Langlois D., *et al.* (2001), Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theoretical and Applied Genetics*, **102**, 2-3, pp. 259-272.
- Salisbury F., Ross C. (1992). *Plant physiology*. 4 éd., Belmont, Calif. : Wadsworth Pub, 682 p.
- Salunkhe D. K., Kadam S. (1995). *Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage, and processing*. CRC Press, 632 p.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning*. Cold spring harbor laboratory press New York, 2028p.
- Samouelian F., Gaudin V. (2009). *Génétique moléculaire des plantes*. Editions Quae, 208 p.
- Sankar A. A., Moore G. (2001), Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, **102**, 2-3, pp. 206-214.
- Sayegh M. (2009). La résistance du cotonnier *Gossypium hirsutum* à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum*: rôle du gène GhLOX1 dans la réaction hypersensible, Vandoeuvre-les-Nancy, INPL, 250p.
- Segura V., Durel C.-E., Costes E. (2009), Dissecting apple tree architecture into genetic, ontogenetic and environmental effects: QTL mapping. *Tree Genetics & Genomes*, **5**, 1, pp. 165-179.
- Sewell M. M., Neale D. B. (2000). Mapping quantitative traits in forest trees. *In: Molecular biology of woody plants*. Springer, pp. 407-423.
- Sexton R., Redshaw A. (1981), The role of cell expansion in the abscission of *Impatiens sultani* leaves. *Annals of Botany*, **48**, 5, pp. 745-756.
- Sexton R., Roberts J. A. (1982), Cell biology of abscission. *Annual Review of Plant Physiology*, **33**, 1, pp. 133-162.
- Shimada T., Nakano R., Shulaev V., *et al.* (2006), Vacuolar citrate/H<sup>+</sup> symporter of citrus juice cells. *Planta*, **224**, 2, pp. 472-480.
- Shimizu, T. Yoshiuka, T. Nagasaki, H. Kaminuma, E. Toyoda, A. Fujiyama, A. and Nakamura, Y. 2012. Whole genome sequencing and mapping analysis for identifying polymorphism among 11 citrus varieties. XII International Citrus Congress - Valencia, Spain S03O03:62.
- Shiu O. Y., Oetiker J. H., Yip W. K., *et al.* (1998), The promoter of LE-ACS7, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a Sol3 transposon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 17, pp. 10334-10339.

- Sinclair W. B., Bartholomew E. T. (1944), Effects of rootstock and environment on the composition of oranges and grapefruit. *Hilgardia*, **16**, 3, pp. 125.
- Sinha N., Sidhu J., Barta J., *et al.* (2012). Handbook of fruits and fruit processing. John Wiley & Sons, 57 p.
- Sipes D. L., Einset J. W. (1983), Cytokinin stimulation of abscission in lemon pistil explants. *Journal of plant growth regulation*, **2**, 1-4, pp. 73-80.
- Smith A. M., Coupland G., Dolan L., *et al.* (2009). Plant Biology. In: *Science G. ed.*, pp. 680.
- Smith D. L., Abbott J. A., Gross K. C. (2002), Down-Regulation of Tomato  $\beta$ -Galactosidase 4 Results in Decreased Fruit Softening. *Plant Physiology*, **129**, 4, pp. 1755-1762.
- Song X., Wang K., Guo W., *et al.* (2005), A comparison of genetic maps constructed from haploid and BC1 mapping populations from the same crossing between *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. *Genome*, **48**, 3, pp. 378-390.
- Spiegel-Roy P., Goldschmidt E. E. (1996). Reproductive physiology: flowering and fruiting. In: *The biology of citrus. press C. u. ed.*, Cambridge, UK, pp. 70-118.
- Stam P. (1993), Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. *The Plant Journal*, **3**, 5, pp. 739-744.
- Staub J. E., Serquen F. C., Gupta M. (1996), Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, **31**, 5, pp. 729-741.
- Stenzel N. M. C., Neves C. S. V. J., Marur C. J., *et al.* (2006), Maturation curves and degree-days accumulation for fruits of Folha Murcha'orange trees. *Scientia Agricola*, **63**, 3, pp. 219-225.
- Sugiyama A., Omura M., Matsumoto H., *et al.* (2011), Quantitative Trait Loci (QTL) Analysis of Carotenoid Content in Citrus Fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **80**, 2, pp. 136-144.
- Susanto S., Nakajima Y. (1990), Effect of winter heating on flowering time, fruiting and fruit development in pummelo grown in a plastic house. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **59**, 2, pp. 245-253.
- Sweetman C., Deluc L. G., Cramer G. R., *et al.* (2009), Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry*, **70**, 11, pp. 1329-1344.
- Swingle W. T. (1967), The botany of Citrus and its wild relatives. *The citrus industry*, pp. 190-430.
- Tadeo F., Simó A., Agustí J., *et al.* (2007), La abscisión de frutos maduros en naranjos dulces del grupo Navel correlaciona con la acumulación de azúcares en el zumo. *Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos*, 389, pp. 393-402.
- Tadeo F. R., Cercós M., Colmenero - Flores J. M., *et al.* (2008), Molecular physiology of development and quality of citrus. *Advances in Botanical Research*, **47**, pp. 147-223.
- Talon M., Gmitter F. G. (2008), Citrus Genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, pp. 17.



- Tanaka T. (1954), Species problem in Citrus, 152p.
- Tanaka T. (1961). Citologia: semi-centennial commemoration papers on citrus studies. In Osaka: Citrologia Supporting Foundation, Vol. 114, pp. 152.
- Tanksley S., Ganai M., Prince J., *et al.* (1992), High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, **132**, 4, pp. 1141-1160.
- Tanksley S. D. (1993), Mapping polygenes. *Annual review of genetics*, **27**, 1, pp. 205-233.
- Tao N., Hu Z., Liu Q., *et al.* (2007), Expression of phytoene synthase gene (Psy) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant cell reports*, **26**, 6, pp. 837-843.
- Tao W., Qing X., Weiguang C. (2001), Study on the Change of Organic Acid Synthetase Activity During Fruit Development of Navel Orange (*Citrus Sinesis* Osbeck). *Journal of Sichuan Agricultural University*, **1**, pp. 161-163.
- Taylor J. E., Tucker G. A., Lasslett Y., *et al.* (1991), Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic tomato plants. *Planta*, **183**, 1, pp. 133-138.
- Terol J., Conesa A., Colmenero J. M., *et al.* (2007), Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC genomics*, **8**, 1, pp. 31.
- Terol J., Naranjo M. A., Ollitrault P., *et al.* (2008), Development of genomic resources for Citrus clementina: characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46,000 BAC end sequences. *BMC genomics*, **9**, 1, pp. 423.
- Terol J., Soler G., Talon M., *et al.* (2010), The aconitate hydratase family from Citrus. *BMC plant biology*, **10**, 1, pp. 222.
- Ting S., Attaway J. (1971), Citrus fruits. *The biochemistry of fruits and their products*, **2**, pp. 107-169.
- Ting S., Vines H. (1966). Organic acids in the juice vesicles of Florida 'Hamlin' orange and 'Marsh Seedless' grapefruit. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, pp. 291-297.
- Torres A. M., Soost R. K., Diedenhofen U. (1978), Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. *American Journal of Botany*, pp. 869-881.
- Tozlu I., Guy C. L., Moore G. A. (1999), QTL analysis of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> accumulation related traits in an intergeneric BC1 progeny of Citrus and Poncirus under saline and nonsaline environments. *Genome*, **42**, 4, pp. 692-705.
- Tudela D., Primo-Millo E. (1992), 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiology*, **100**, 1, pp. 131-137.
- Turk R., AC't Hoen P., Sterrenburg E., *et al.* (2004), Gene expression variation between mouse inbred strains. *BMC genomics*, **5**, 1, pp. 57.
- UNCTAD.Agricultural products-Citrus.<http://www.unctad.info/en/Infocomm/>
- Utsunomiya N., Yamada H., Kataoka I., *et al.* (1982). The effect of fruit temperatures on the maturation of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruits. In Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan).
-

- Vales M., Schön C., Capettini F., *et al.* (2005), Effect of population size on the estimation of QTL: a test using resistance to barley stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics*, **111**, 7, pp. 1260-1270.
- Van Ooijen J. (2006), JoinMap 4. *Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations*. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands, 147p.
- Van Ooijen J., Kyazma B. (2009), MapQTL 6. *Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species*. Kyazma BV: Wageningen, Netherlands, 90 p.
- Vettore A., da Silva F., Kemper E., *et al.* (2003), Analysis and Functional Annotation of an Expressed Sequence Tag Collection for Tropical Crop Sugarcane. *Genome Res*, **13**, 12, pp. 2725 - 2735.
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., *et al.* (2002), A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, **34**, 3, pp. 275-306.
- Voorrips R. (2002), MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, **93**, 1, pp. 77-78.
- Vu J. C., Yelenosky G. (1991), Photosynthetic responses of citrus trees to soil flooding. *Physiologia Plantarum*, **81**, 1, pp. 7-14.
- Wardowski W. F., Nagy S., Grierson W. (1986). Fresh citrus fruits. Avi Publishing Company, Inc., 571 p.
- Webber H. J. (1943), Cultivated varieties of citrus. *The citrus industry*, **1**, pp. 475-668.
- Weschke W., Panitz R., Gubatz S., *et al.* (2003), The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *The Plant Journal*, **33**, 2, pp. 395-411.
- Wilson W., Hendershott C. (1968). Anatomical and histochemical studies of abscission of oranges. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci*, pp. 203-10.
- Wu G. A., Prochnik S., Jenkins J., *et al.* (2014), Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature biotechnology*, pp. 656–662.
- Wu J.,\* Li LT., Li M., *et al.*, (2014). High-density genetic linkage map construction and identification of fruit-related QTLs in pear using SNP and SSR markers. *Journal of Experimental Botany*, 11 p.
- Wu Z., Burns J. (2000). Expression of polygalacturonase, bgalactosidase, chitinase, b-1, 3-glucanase and expansin during mature fruit abscission of Valencia orange. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, pp. 689-690.
- Wu Z., Burns J. K. (2004), A  $\beta$ -galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of ‘Valencia’ orange (*Citrus sinensis*). *Journal of experimental botany*, **55**, 402, pp. 1483-1490.

Wurgler-Murphy S. M., Saito H. (1997), Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in biochemical sciences*, **22**, 5, pp. 172-176.

Xu, Q. Chen, L.L. Ruan, X. Chen, D. et al. (2013). The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat.Genet.* 45:1:59-66.

Yakushiji H., Morinaga K., Nonami H. (1998), Sugar accumulation and partitioning in Satsuma mandarin tree tissues and fruit in response to drought stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **123**, 4, pp. 719-726.

Young R. E., Romani R. J., Biale J. B. (1962), Carbon dioxide effects on fruit respiration. II. Response of avocados, bananas, & lemons. *Plant Physiology*, **37**, 3, pp. 416.

Ytournal F., Gilbert H., Boichard D. (2008), Comment affiner la localisation d'un QTL? *INRA Prod. Anim*, **21**, 2, pp. 147-158.

Yuan R., Hartmond U., Kender W. J. (2001), Physiological Factors Affecting Response of MatureValencia'Orange Fruit to CMN-Pyrazole. II. Endogenous Concentrations of Indole-3-Acetic Acid, Abscisic Acid, and Ethylene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **126**, 4, pp. 420-426.

Yuan R., Kender W. J., Burns J. K. (2003), Young Fruit and Auxin Transport Inhibitors Affect the Response of MatureValencia'Oranges to Abscission Materials via Changing Endogenous Plant Hormones. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **128**, 3, pp. 302-308.

Yuan R., Wu Z., Kostenyuk I. A., et al. (2005), G-protein-coupled  $\alpha$ 2A-adrenoreceptor agonists differentially alter citrus leaf and fruit abscission by affecting expression of ACC synthase and ACC oxidase. *Journal of experimental botany*, **56**, 417, pp. 1867-1875.

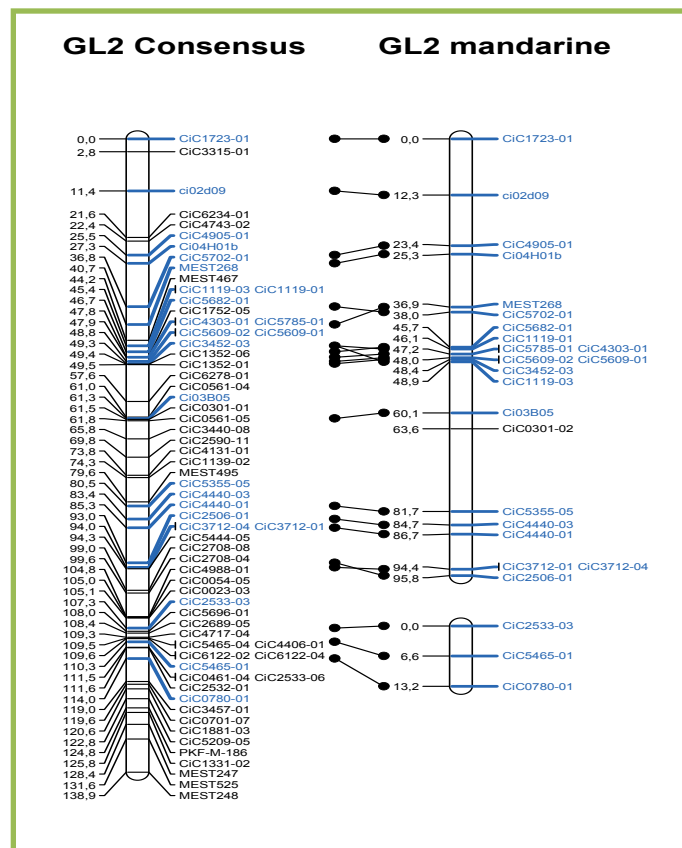
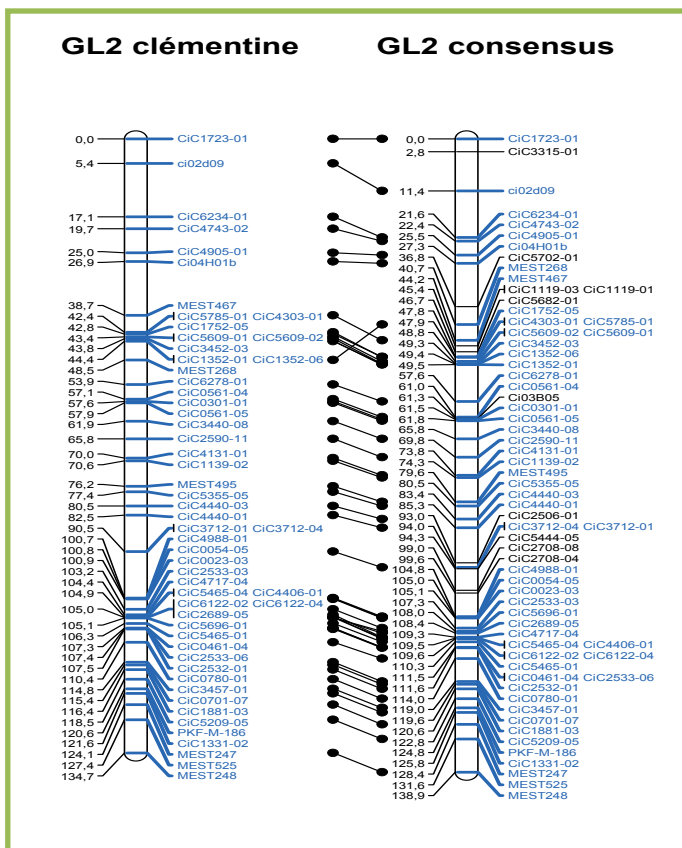
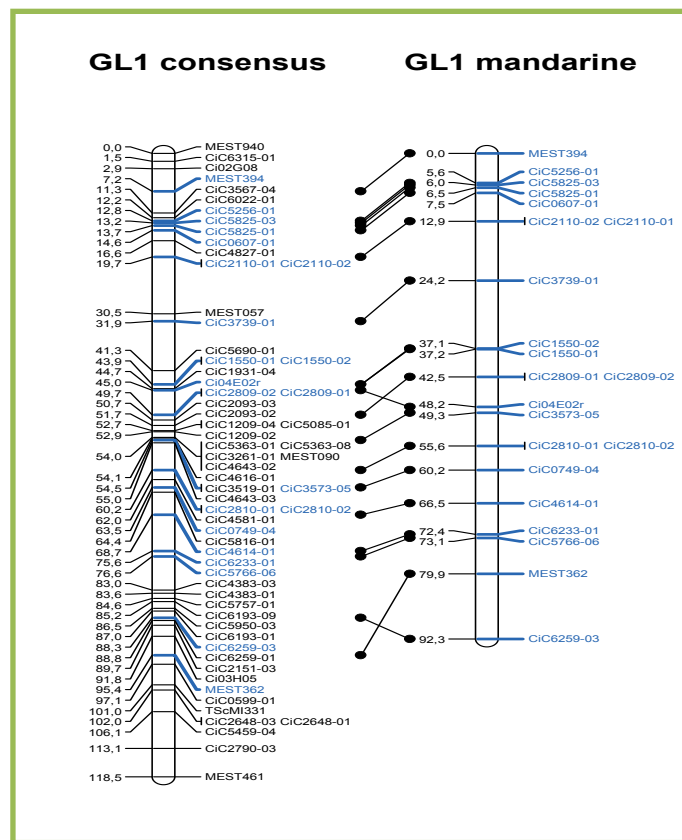
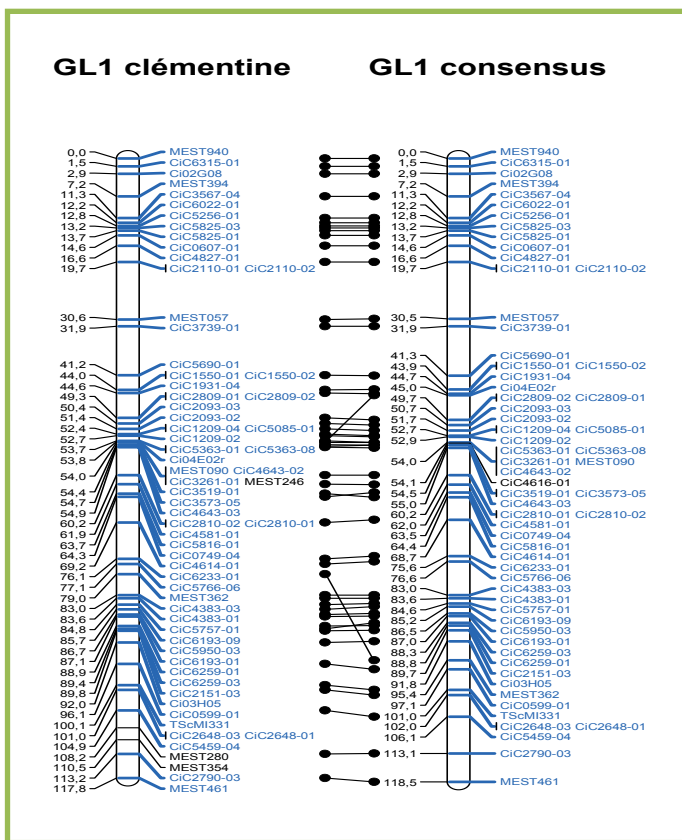
Zeng Z.-B. (1994), Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, **136**, 4, pp. 1457-1468.

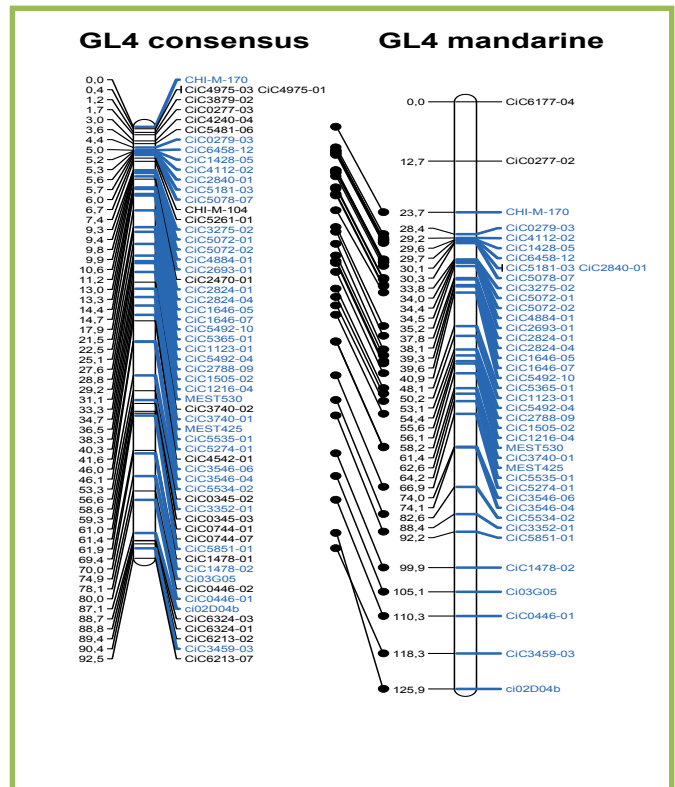
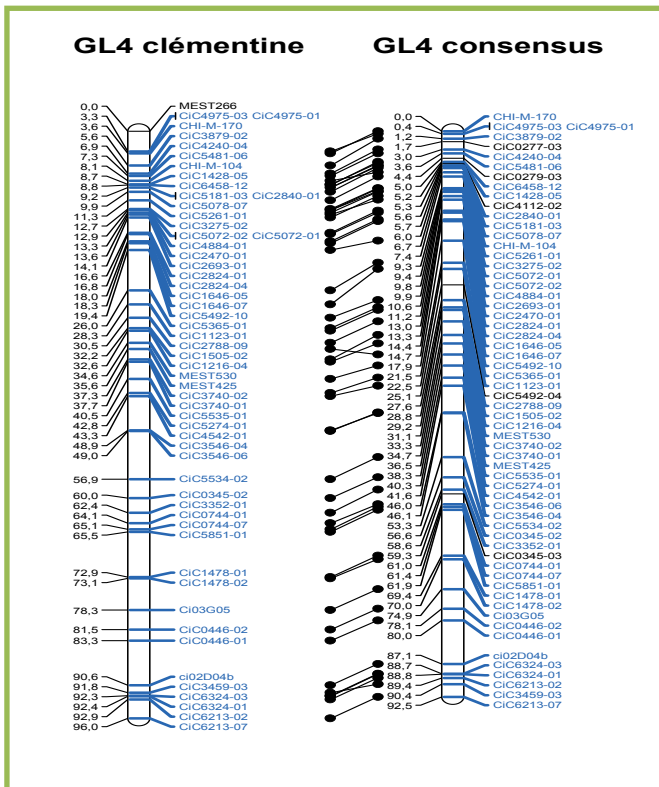
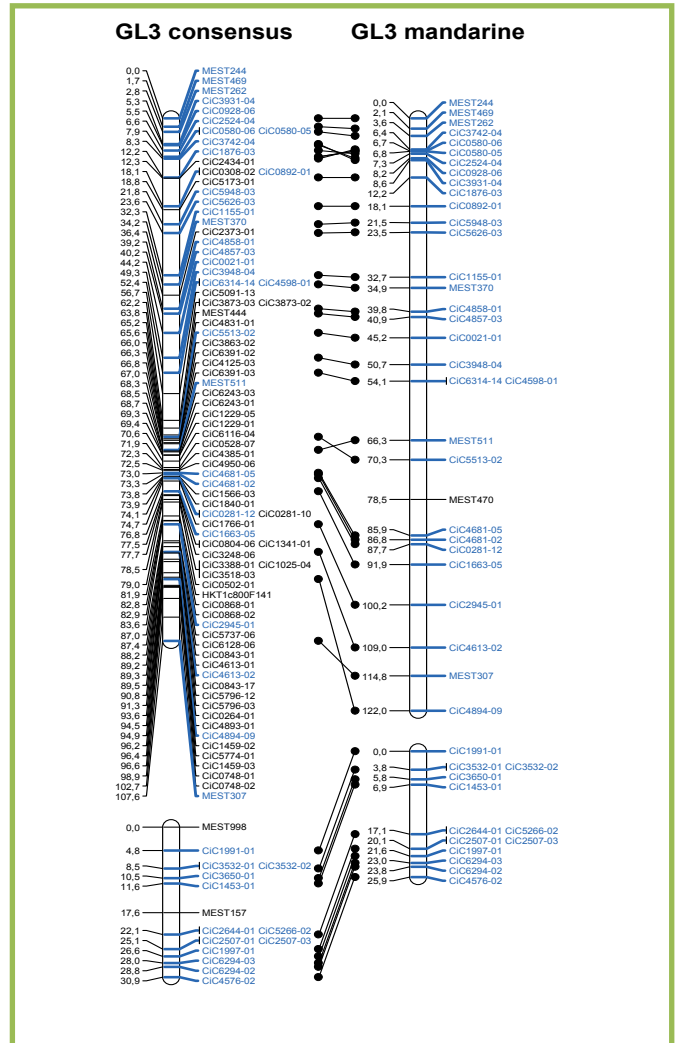
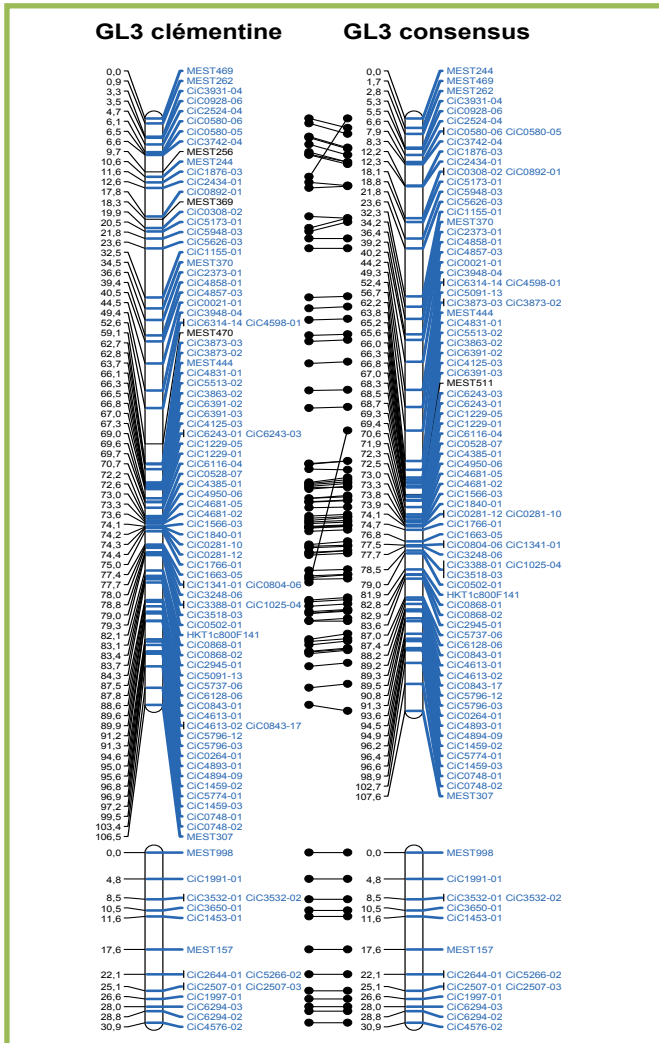
Ziaf K., Nafees M., Saleem B. A., et al. (2004). Prospect of mechanical harvesting and abscission in citrus. pp. 5.

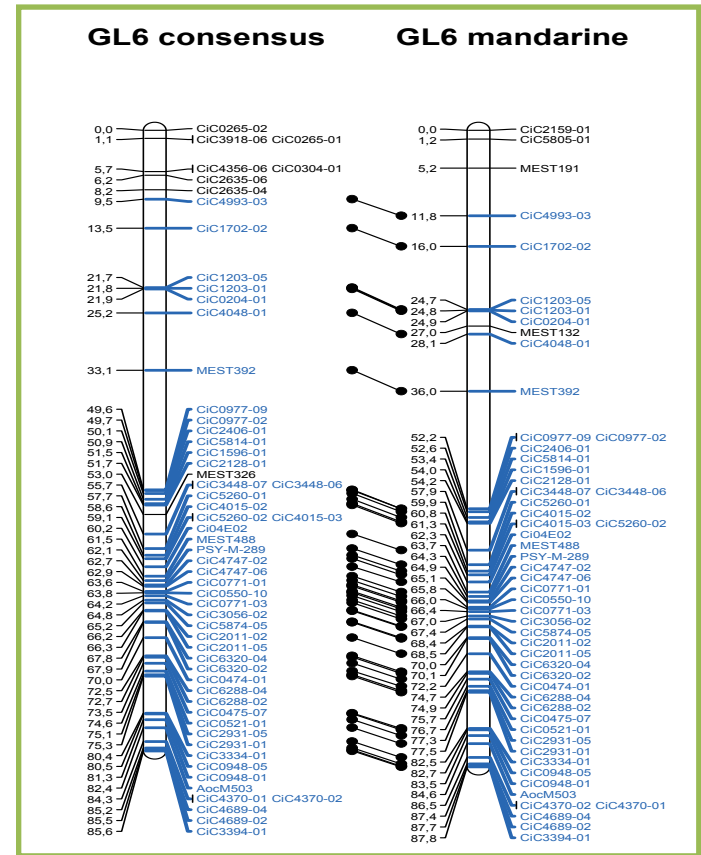
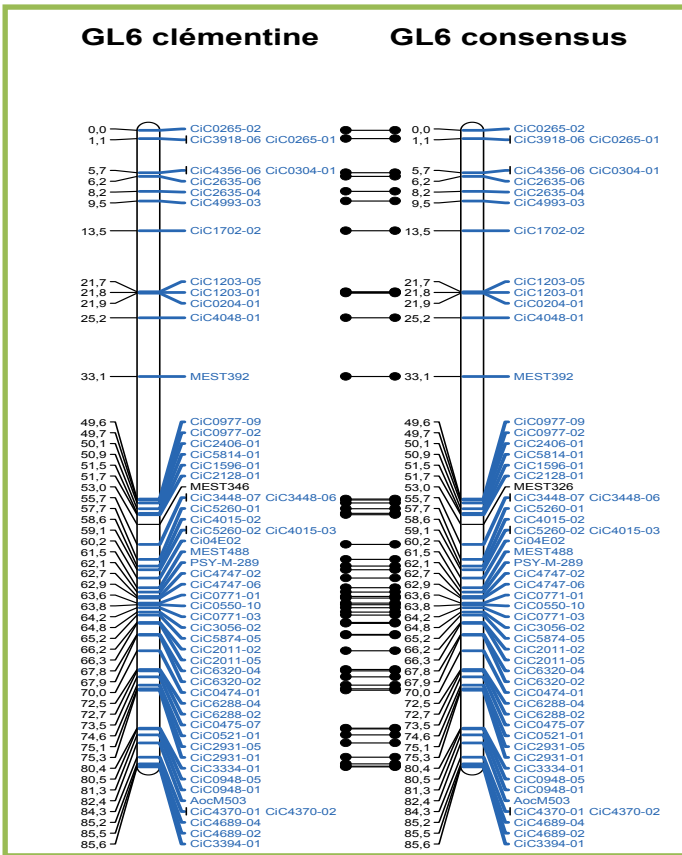
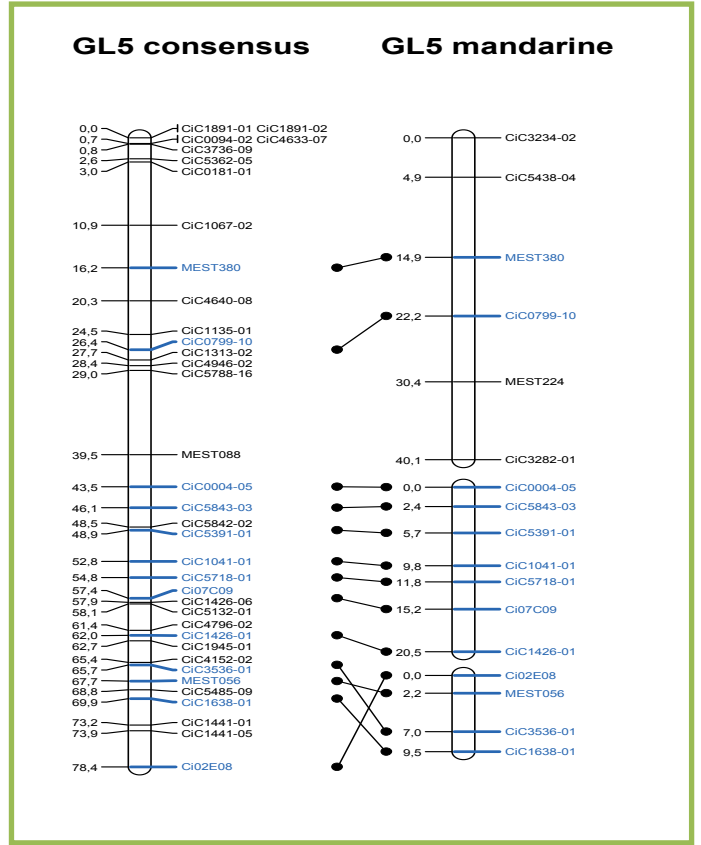
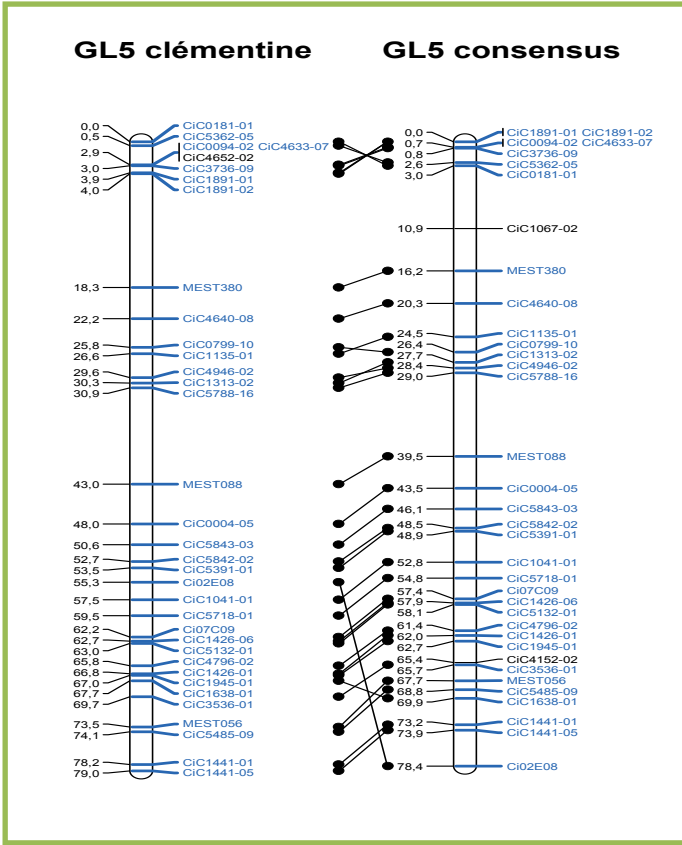
## ***Annexes***

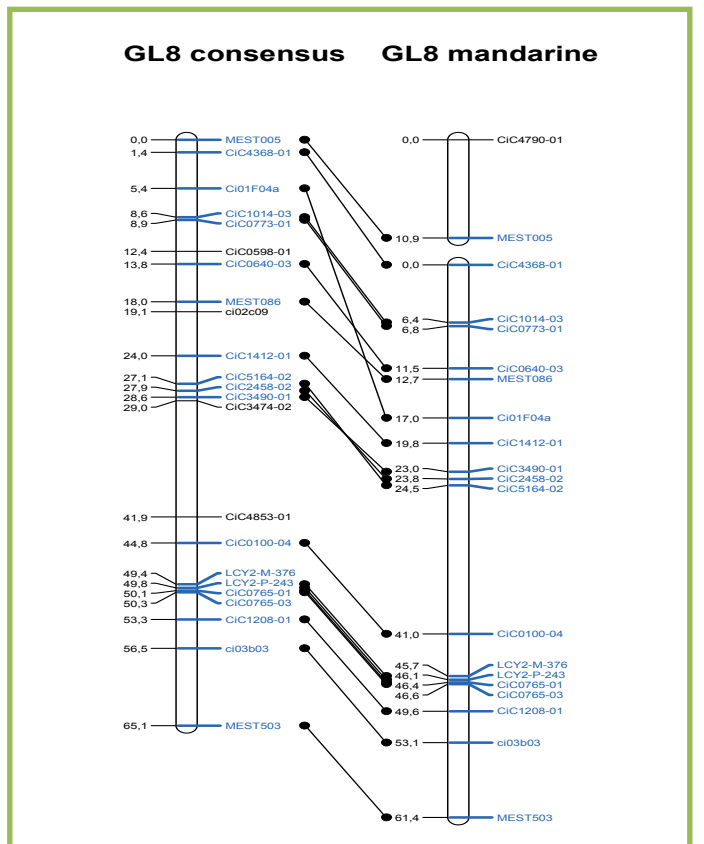
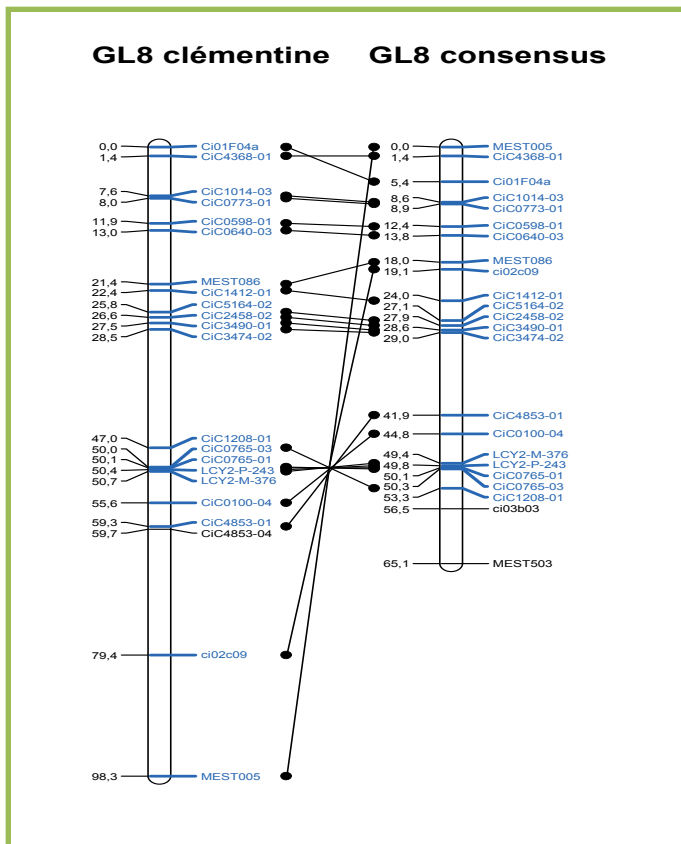
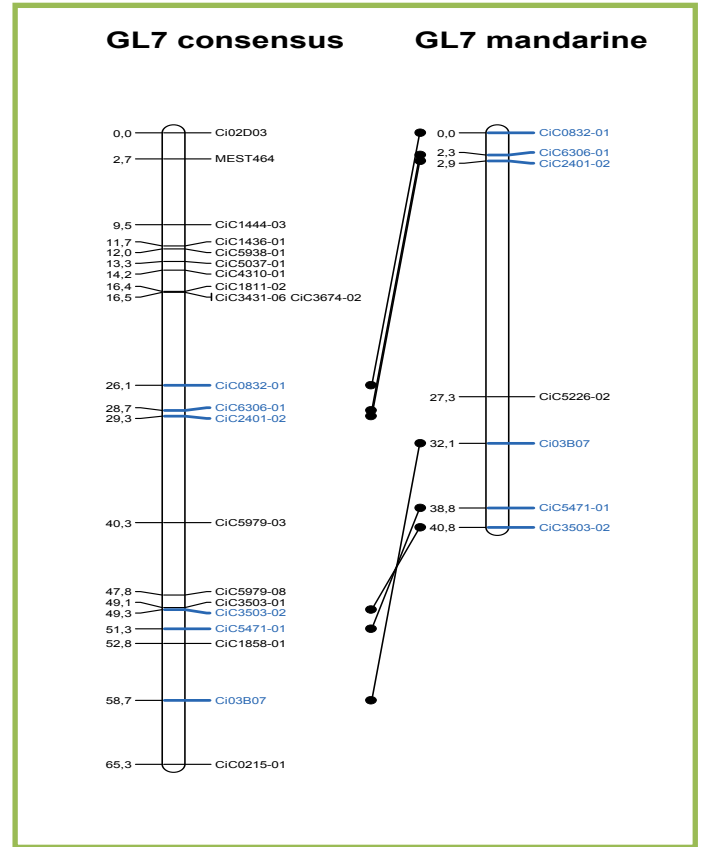
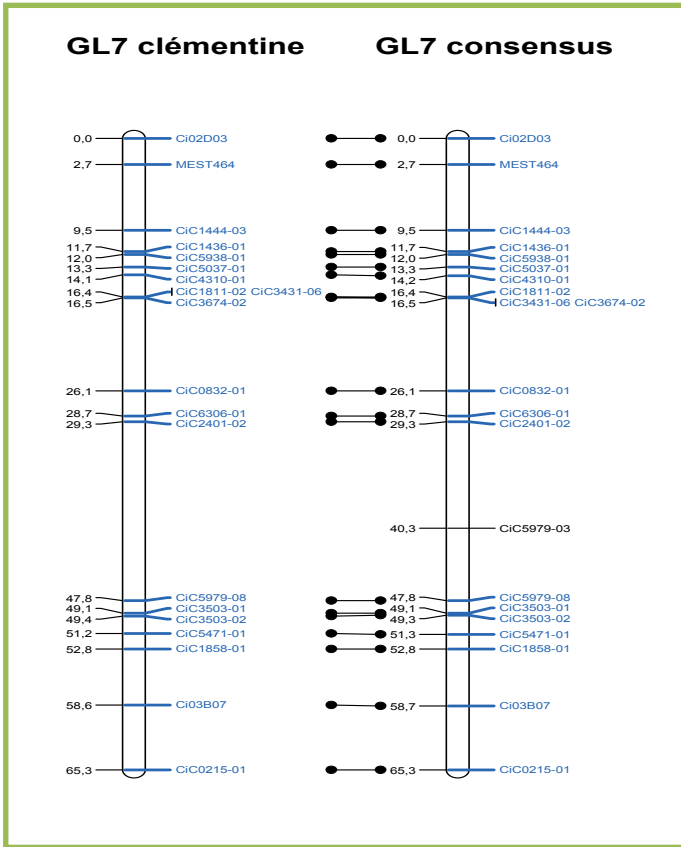
---

1. Annexes des chapitres II et III











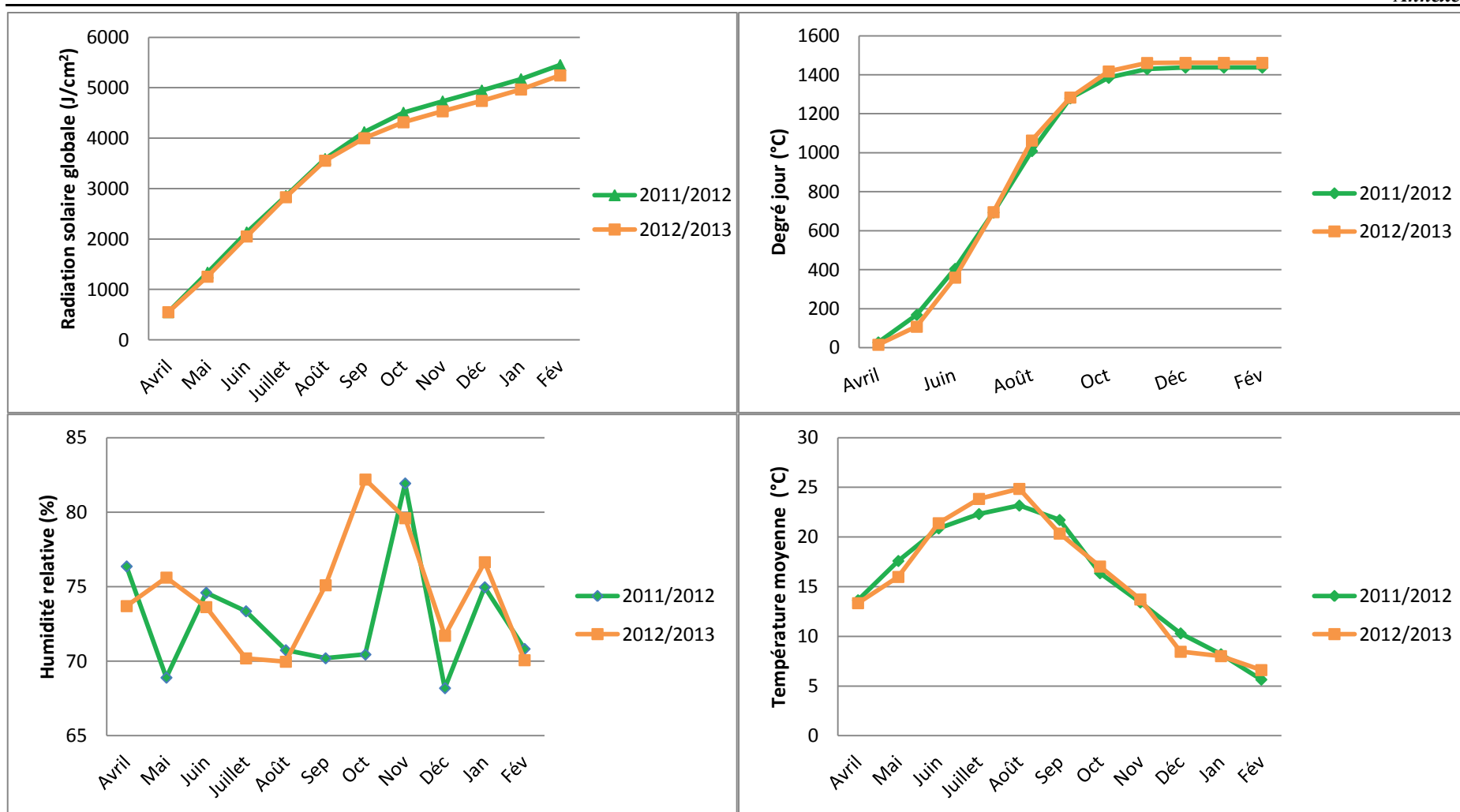


**Annexe 2.** Résumé des valeurs des caractères mesurés au sein de la population et des deux parents, clémentinier et mandarinier à chacune des 4 dates de mesure

Population clémentinier × mandarinier							
Caractère	Date de prélèvement	Moyenne de la mandarine	Moyenne de la clémentine	Moyenne de la population	Ecart type	Min	Max
Masse du fruit (g)	Octobre 2011	26.2	33.6	24.4	7.1	13.8	49.8
	Novembre 2011	44.7	56.7	44.3	16.7	17.2	90.7
	Janvier2012	69.6	75	57.0	17.2	15.1	108.2
	Février 2012	85.1	81.0	60.1	17.3	19.7	107.9
Pourcentage du jus (g)	Octobre 2011	26.3	22.8	19.1	7.0	3.2	39.6
	Novembre 2011	45.5	40.8	31.8	7.8	9.0	46.5
	Janvier2012	51.8	39.0	31.2	8.6	6.8	48.1
	Février 2012	50.1	39.3	28.0	10.1	2.6	80.9
pH	Octobre 2011	3.3	3.4	3.4	0.3	1.1	4.0
	Novembre 2011	3.1	3.8	3.6	0.3	3.1	5.0
	Janvier2012	3.3	4.1	4.2	0.4	3.4	5.7
	Février 2012	3.5	4.5	4.2	0.4	3.4	5.1
TSS (°Brix)	Octobre 2011	6.8	7.4	2.7	1.3	2.9	9.8
	Novembre 2011	7.0	8.3	6.1	1.1	4.7	10.7
	Janvier2012	9.6	10.0	8.7	1.4	5.1	14.4
	Février 2012	10.5	10.2	9.1	1.4	5.2	14.1
Acidité (g/100g)	Octobre 2011	4.9	2.5	1.4	0.8	0.8	4.6
	Novembre 2011	2.7	1.1	1.3	0.5	0.5	3.0
	Janvier2012	1.6	0.5	0.7	0.3	0.2	2.4
	Février 2012	1.3	0.4	0.7	0.3	0.2	1.6
Force de détachement du fruit (N)	Octobre 2011	30.4	46.5	28.2	8.0	9.7	43.8
	Novembre 2011	23.9	43.2	22.2	7.9	3.1	42.2
	Janvier2012	27.3	36.7	23.2	7.2	8.5	44.8
	Février 2012	33.2	31.0	20.5	9.1	2.9	43.1
Diamètre équatorial (mm)	Octobre 2011	-	-	-	-	-	-
	Novembre 2011	44.7	48.0	43.8	6.0	32.2	58.7
	Janvier2012	52.1	59.6	49.0	5.3	30.7	61.6
	Février 2012	56.6	56.9	50.1	5.4	33.0	60.4
Diamètre polaire (mm)	Octobre 2011	-	-	-	-	-	-
	Novembre 2011	38.5	43.9	39.1	5.4	29.7	53.2
	Janvier2012	42.8	52.7	42.0	5.7	26.9	57.8
	Février 2012	46.1	50.3	42.6	5.7	30.6	57.2
Largeur du pédoncule (mm)	Octobre 2011	-	-	-	-	-	-
	Novembre 2011	2.4	3.0	2.7	0.4	1.9	3.8
	Janvier2012	2.5	3.3	2.5	0.4	1.5	3.4
	Février 2012	2.3	2.8	2.7	0.4	1.7	3.5

CCI	Octobre 2011	-	-	-	-	-	-
	Novembre 2011	-14.0	-7.1	-9.1	7.4	-25.1	4.9
	Janvier 2012	-1.3	1.0	4.1	3.7	-7.0	11.0
	Février 2012	4.7	8	5.5	2.6	-3.9	10.4
Indice de couleur b*	Octobre 2011	-	-	-	-	-	-
	Novembre 2011	-16.1	-12.8	-9.1	7.5	-18.8	19.8
	Janvier 2012	-4.0	34.7	16.6	11.9	-9.1	35.9
	Février 2012	18.5	35.3	21.6	8.9	-7.5	35.2
Indice de couleur b*	Octobre 2011	-	-	-	-	-	-
	Novembre 2011	28.0	36.6	34.5	14	12.3	63.3
	Janvier 2012	58.5	58.8	58.7	6.2	39.9	69.1
	Février 2012	58.9	61.6	60.2	5.1	39.2	68.4

(-) pas des données



**Annexe 3.** Comparaison des données climatiques sur deux campagnes de fructification successives 2011/2012 et 2012/2013

## 2. *Proceeding et participations aux congrès*

**Annexe 4.** Proceeding publié dans Acta Horticulturae.1065, International Citrus Congress Valencia, 2015

### **ABSCISSION STUDY DURING CITRUS FRUIT MATURATION IN CORSICA: UNFAVORABLE ENVIRONMENTAL CONDITIONS FOR FRUIT SHEDDING**

Hajer Khefifi<sup>1,2</sup>, M. Ben Mimoun<sup>2</sup>, R. Morillon<sup>1</sup> and F. Luro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA/CIRAD (UR 'GEQUA'/APMV), 20230 San Giuliano, France, <sup>2</sup>INAT, 43, Avenue Charles Nicolle 1082 -Tunis- Mahrajène, Tunisie

#### **ABSTRACT**

Citrus fruit development and ripening are complex processes involving physiological and biochemical changes that are under hormonal, nutritional and environmental control. One of the most evident phenomena in late maturation is shedding of ripe fruit. A study made in Spain on sweet oranges showed that fruit shedding was related to the increase of sugars content of fruit pulp juice. To investigate this potential relationship between fruit abscission and internal maturity parameters we investigated the fruit maturity process of 10 Clementine x Mandarin hybrids and 9 commercial sweet orange varieties with different maturity period. Morphological and biochemical analyses (acidity, total soluble solids, fruit weight thickness of the flavedo, thickness of the peduncle, external color) were carried out on fruit sets of the different varieties during the maturation process, from December to June. The abscission initiation was evaluated by measuring the force required to detach the fruit of the peduncle. Analysis showed that under the local conditions, abscission was generally not expressed even through fruit maturation was evolving. Therefore, we suppose that even though the local conditions have an important effect, abscission of citrus fruit results also from environmental-genotype interactions. Moreover, evolution of abscission and fruit parameters are not correlated suggesting the independence in the process of maturation and abscission under the environmental conditions of Corsica.

**Key words:** Oranges, Fruit development, acidity, total soluble solid, Fruit drop, FDF

#### **INTRODUCTION**

Citrus fruit maturation is a well-coordinated and genetically determined biological process involving sugar conversion, acids accumulation, biosynthesis of pigment, flavor and aroma volatiles and changes in cell wall polysaccharide composition (Iglesias *et al.*, 2007; Ladaniya, 2008). All these physiological and biochemical changes occurring during fruit maturation lead generally to fruit shedding in many varieties (Racsko *et al.*, 2006). As other non-climacteric fruit, the physiological maturity of citrus fruit corresponding to the commercial maturity status happens on tree (Katz *et al.*, 2004). Early citrus fruit shedding that may occur before commercial maturity is reached remains a major problem for maturity citrus cultivars in many producing countries. Therefore, to improve fruit production it is necessary to evaluate the conditions of expression of the fruit drop taking account of climate and genotype impact. Furthermore, limited information is available on the initiation of this process and plant internal factors that cause this fruit drop. Some studies of this process during sweet orange maturation show that there is a relationship between evolution in sugar and acidity

concentration and fruit drop (Tadeo et al., 2007). For example the study conducted in sweet oranges of the navel group under Valencia (Spain) conditions revealed a strong correlation between the sugar accumulation and the Fruit Detachment Force drop. Indeed, meanwhile the sugar concentration increases the FDF decreases leading to the shedding fruit. Thus, it is suggested that sugars and acidity may also be implicated in the regulation of fruit abscission that occurs in the end of maturation phase. Basing in this we propose that fruit shedding is more or less related to the fruit parameter maturation.

The aim of the present work was to determine whether a possible correlation could be established, depending of the investigated cultivar, between fruit maturation and abscission.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plant material**

A progeny of 100 Clementine (*C. clementina*) x Mandarin Willow leaf (*C. deliciosa*) hybrids and nine orange varieties (*C. sinensis*) with different maturity time were chosen: three early varieties ('Salustiana', 'Navelina', 'Hamlin'), three varieties of mid-season ('Washington navel', 'Shamouti', 'Moro') and three late varieties ('Navelate', 'Valencia late', 'Maltaise blonde'). All genotypes were grafted on Carrizo citrange and were grown under the same conditions in INRA-CIRAD collection at the INRA research unit in Corsica. Fruits were harvested monthly from the southeast tree side. Fruits were selected by uniformity of size, appearance and absence of abiotic and biotic stress symptoms. The sampling periods ranged from 3 Oct 2011 to 7 Feb 2012 for Clementine x Mandarin hybrids and from 20 Dec 2011 to 31 May 2012 for commercial orange varieties.

### **Physical and chemical Measurements**

Morphological and biochemical analyses (weight, polar and equatorial diameter, external color, peduncle thickness, peel thickness, juice percentage, juice acidity and total soluble solid (TSS)) were carried out monthly on fruit sets of the different varieties during the maturation process. Nine fruits of each genotype were used for analysis.

Fruit acidity was determined along fruit growth by titration of 1 ml of fresh juice extract with 0.1M NaOH using automatic titrator. Total acidity was used as indirect measurement of the citric acid concentration, the dominant acidic compound in citrus fruit juice and major responsible of fruit acidity. The results were presented as melliequivalent of citrate. The soluble solid content was determined by digital refractometry at room temperature. Fruit color was measured through the CIE L\*a\*b\* system using Minolta chroma-meter CR-200 (Minolta, Ramsey, NJ).

### **Determination of fruit detachment force**

Fruits were harvested from the trees with 5-7 cm attached stems. Fruit detachment force (FDF) was determined by using a digital force gauge. Fruit stems were inserted into the gauge and the stem pulled parallel to the fruit axis until it separated from the fruit. FDF was expressed in Newtons.

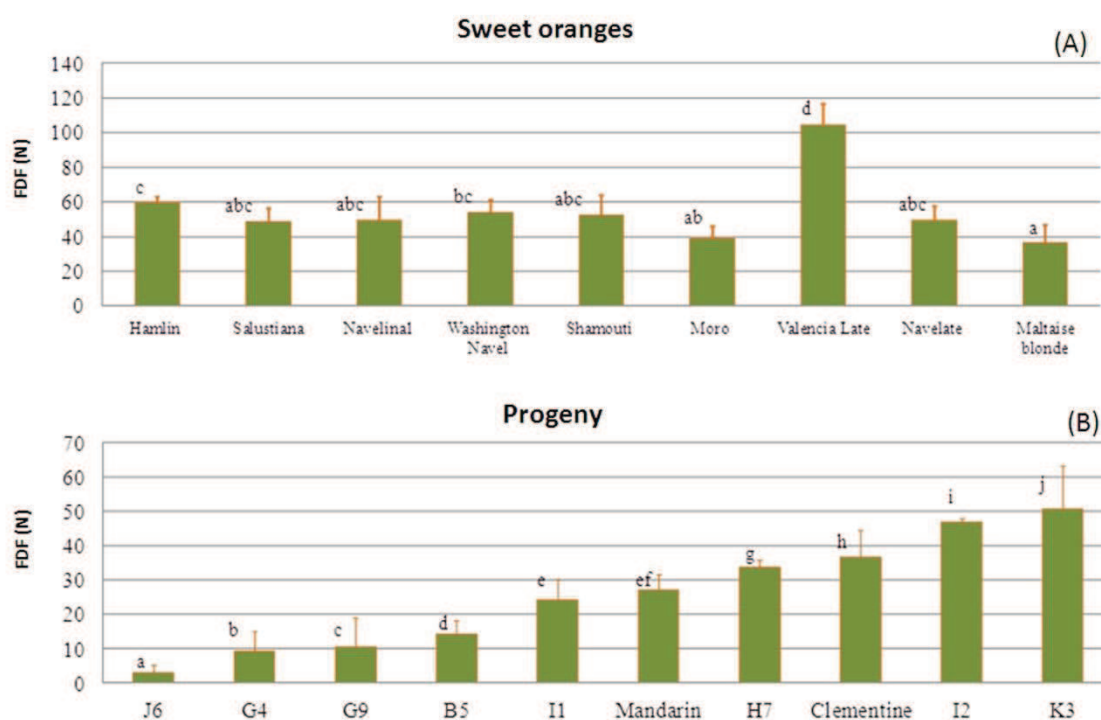
### **Statistical Analysis**

Statistical analyses were made with Statistica 10. Correlation coefficients and their probabilities were analyzed with a Pearson's correlation coefficient.

## RESULT AND DISCUSSION

### Differences between citrus genotypes in term of FDF intensity

The FDF parameter varied between genotypes of the two populations especially in the progeny (Fig.1). The intensity of FDF in February was on average higher for sweet oranges than for the Clementine x Mandarin hybrids, which ranged from 105 N (‘Valencia late’) to 3 N (hybrid I6). The variation of FDF between orange varieties was lowest than observed in the progeny. Between the smallest and the highest value, 3 and 10 folds changes were observed for orange and hybrids of the progeny, respectively. This could be partially explained by the degree of genetic variability between the two populations. Between oranges, the variability is based on mutations while in progeny population, variability depends on allelic combinations obtained by sexual cross. Then, the FDF may be under genetic control.



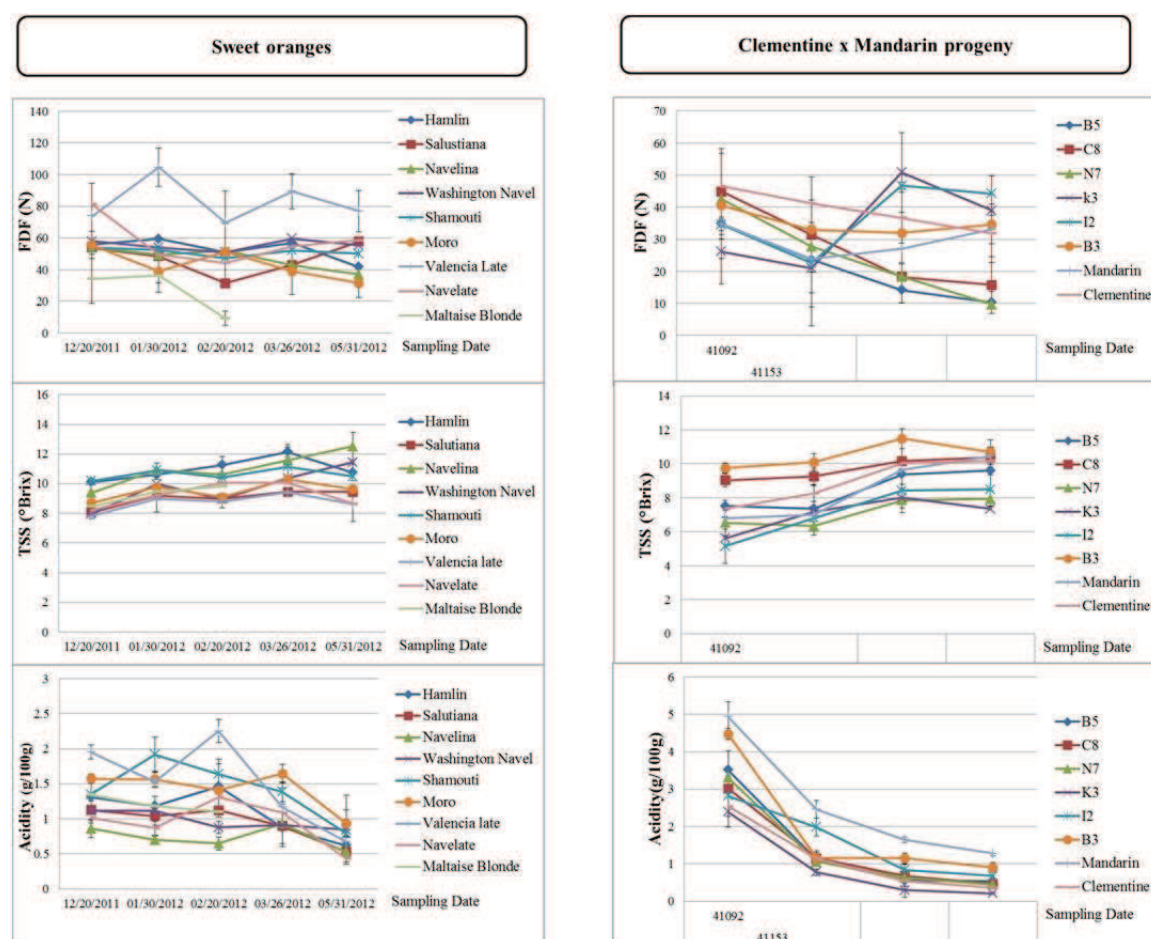
**Fig. 1.** Fruit detachment force determined for sweet oranges and few Clementine x Mandarin hybrids in 02/20/2012

The ‘Maltaise blonde’ presents the lowest average value of the FDF while ‘Valencia late’ presents the highest value (**fig. 1A**). These two varieties belong both to the late maturing varieties group. The second homogenous group includes early maturing varieties (‘Navelina’, ‘Salustiana’, and ‘Hamlin’), mid-season maturing varieties (‘Shamouti,’ Washington Navel) and late maturing varieties (‘Navelate’). No correlation between the intensity of the FDF and the classification of varieties according to their maturity periods was observed. This result suggests that fruit abscission measured through FDFs do not depend on the commercial fruit maturation stage.

### **Variation of FDF and fruit parameters during maturation stage**

Contrary to the results obtained in Spain (Tadeo *et al.*, 2007) and to our initial hypothesis which supposed that FDFs gradually decrease during citrus fruit maturation regardless the genotype studied, Fig.1 shows that this parameter did not change for most varieties ('Hamlin', 'Washington Navel', 'Salustiana', 'Valencia late', 'Navelate', 'Shamouti') except for the 'Maltaise blonde' throughout all the experimental period. In orchard, the decrease in FDF observed in the 'Maltaise blonde', a late maturing variety, was traduced by the shedding of a high number of fruit. By the end of February, this variety lost all their fruits. However, five months after this date the other varieties still retained their fruits. For Clementine x Mandarin progeny, this parameter decreased for a few genotypes (B5, C8, and N7) and remained constant for a large majority of the offspring and parents. In parallel, TSS and acidity presented the same profile for all genotypes regardless of their FDF behavior. In fact, when the concentration of soluble sugars increased, the acidity decreased regardless of the biological material. These results suggest that the evolution of maturation does not trigger fruit shedding under the environmental conditions of Corsica. These results are not in agreement with the results obtained in Spain where the accumulation of sugar in the juice of citrus fruit was closely related to pre-harvest abscission in sweet oranges of the navel group. In fact, during maturation process in 'Washington navel' fruit under Spanish conditions, from the beginning of august, the evolution curve of TSS shows an accelerated slope revealing an acceleration of sugars accumulation which is accompanied by a rapid decrease of FDF (Tadeo *et al.* 2007). The synchronization of these two events reveals a strong relationship between the TSS, parameter of fruit maturation, and abscission. Under the environmental conditions of Corsica, this kind correlation is not observed. The comparison of the results of the two studies suggests the strong effect of the environmental conditions in fruit maturation and by consequence, in abscission. Indeed, many studies showed that climatic conditions have a very significant effect on fruit quality and in some cases this effect is more predominant than any other factor including even genetic factors. For example, for the same varieties, the accumulation speed of TSS varies under climatic conditions (Ladaniya, 2008).





**Fig. 2. Kinetic of FDF, TSS and acidity evolution during fruit maturation in sweet orange varieties (left) and in the Clementine x Mandarin progeny (right)**

Does fruit abscission represented by the decrease in FDF, depend on fruit characteristics or maturity parameters?

The Pearson's correlation coefficient between FDF and other fruit parameters varied between 0.06 and 0.3 (Table 1). These results demonstrate that there is no significant correlation between FDF and chemical parameters of maturation either in orange varieties or in hybrids. Furthermore, fruit weight and peduncle thickness do not have any influence on fruit abscission. Therefore we consider that FDF cannot be considered as dependent from the parameters of maturation and fruit morphology investigated in this study.

**Table 1. Pearson's correlation coefficients between FDF and fruit parameters within oranges and Clementine X Mandarin progeny**

	Fruit weight (g)	Peduncle thickness (mm)	% of juice	TSS (°Brix)	pH	Acidity (meq citrate/100g Fruit Pulp)	Maturity index	Color index
Oranges	-0.1081	0.1156	-0.0710	-0.1819	-0.0904	0.0535	-0.0648	0.3709
Progeny	0.3823	0.2489	-0.0185	-0.0291	0.0623	-0.0522	0.0452	-0.0468

## CONCLUSION

The local conditions of Corsica Island appear to be unfavorable for fruit abscission for the majority of the sweet oranges, clementine, mandarin and their related hybrids. Fruit

abscission is independent of juice sweetness and acidity evolution during fruit maturation. These results suggest that the environment could have a significant effect on fruit abscission and genotype x environment interactions could be the basis for the observed effect. Thus there is still an intense effort that must be invested in order to obtain further information on citrus fruit shedding during maturation.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This Work was supported by INRA, CIRAD and Carthage University.

## **REFERENCES**

Iglesias, D.J. Cercós, M. Colmenero-Flores, JM. Naranjo, M.A. Ríos, G. Carrera, E. Ruiz-Rivero, O. Lliso, I. Morillon, R. Tadeo, F.R. and Talon, M. 2007. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology*.19: 333-362.

Katz, E. Lagunes, P.M. Riov, A.J. Weiss, D. and Goldschmidt, E. 2004. Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system II-like pathway of ethylene production in non-climacteric Citrus fruit. *Plantae*. 219:243–252.

Ladaniya, S.M. 2008. *Citrus fruit: Biology, technology and evaluation*. Elsevier, USA.

Racsko, J. Soltész, M. Szabo, Z. and NyékiJ. 2006. Fruit drop: II. Biological background of flower and fruit drop. *International journal of horticulture science*. 12: 13-108.

Tadeo, F.R. Simó, A. Agustí, J. Merelo, P. Iglesias, D.J. Usach, A. Boix, A. Buj, A. Bono, R. and Talón, M. 2007. La abscisión de frutos maduros en naranjos dulces del grupo Navel correlaciona con la acumulación de azúcares en el zumo. *Levante Agrícola*. 4:1-7.

**Annexe 5.** Poster présenté au congrès international des agrumes à Valence, Espagne, Novembre, 2012

Poster ID:S06P10

**Abscission study during citrus fruit maturation in Corsica: unfavorable environmental conditions for fruit shedding**



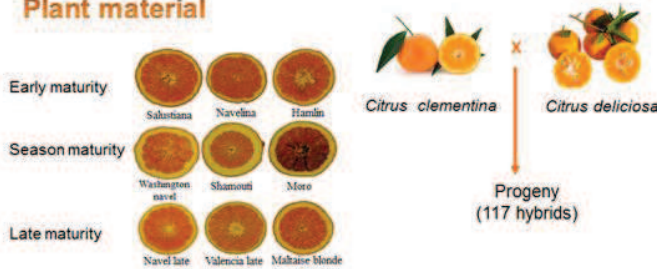
Hajer Khefifi<sup>1,2</sup>, Mehdi Ben Mimoun<sup>2</sup>, Raphaël Morillon<sup>1</sup>, François Luro<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>INRA/CIRAD (UR 'GEQUA/APMV'), 20230 San Giuliano, France. <sup>2</sup>INAT, 43, Avenue Charles Nicolle 1082 - Tunis - Mahragène Tunisie



**Introduction**

Fruit maturation is characterized by physiological and biochemical changes that may lead to fruit shedding. This morphogenetic process marks the end of maturation and the beginning of senescence. Therefore we suppose that abscission and maturation are two correlated phenomena. Some studies of abscission process during fruit maturation show that there is a relationship between changes in sugar and acidity concentration and fruit drop (Tadeo et al. 2007). The aim of the present work was to study the interaction between the maturation parameters and fruit drop in Corsica in order to elucidate the type of correlation that could exist between the fruit maturation and the abscission.

**Plant material**



**Methods**

- Fruit Physical and chemical parameters (weight, polar and equatorial diameter, external color, peduncle thickness, peel thickness, juice acidity and total soluble solid (TSS)) were measured monthly, on nine fruits.
- Fruit acidity was determined by titration with automatic titrator and expressed in meliequivalence of citrate.
- The soluble solid content was determined by digital refractometer at room temperature.
- Fruit detachment force (FDF) was measured by using a digital force gauge (expressed in Newtons).
- Statistical analyses were made with Statistica 10.

**Results and Discussion**

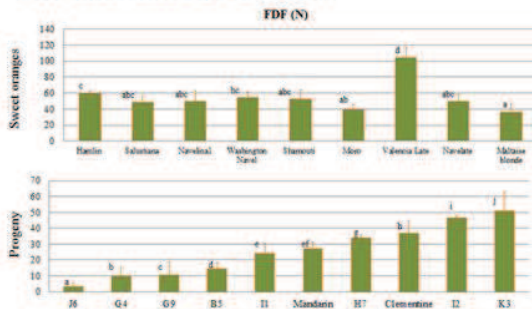


Figure 1. Fruit detachment force determined for sweet oranges and Clementine X Mandarin progeny in 02/20/2012

- FDF parameter varies between genotypes of the two populations especially in the cross (Fig1 ). The intensity of FDF is on average higher for sweet oranges than in the Clementine x Mandarin progeny, and ranges between Valencia late (105 N) and I6 (3 N). Then, the FDF seems to be dependent to the genotype.
- During fruit development, in orange group FDF, remains constant (except for Maltaise blonde) throughout all the experimental period (Fig 2). For Clementine x Mandarin progeny this parameter decreases for a few genotypes (B5, C8, N7) but remains constant for a large majority of the offspring's and parents. In parallel, TSS increases and acidity decreases whatever the biological material during fruit maturation. These results suggest that the evolution of maturation do not trigger fruit shedding in Corsica conditions.
- The independence of fruit abscission initiation revealed by the decrease of FDF, with the evolution of primary metabolites in fruit is confirmed by the analysis of correlation (Pearson) between FDF and fruit parameters (Table). Abscission phenomenon is also independent of the physical characteristics of fruit weight and diameter of peduncle.

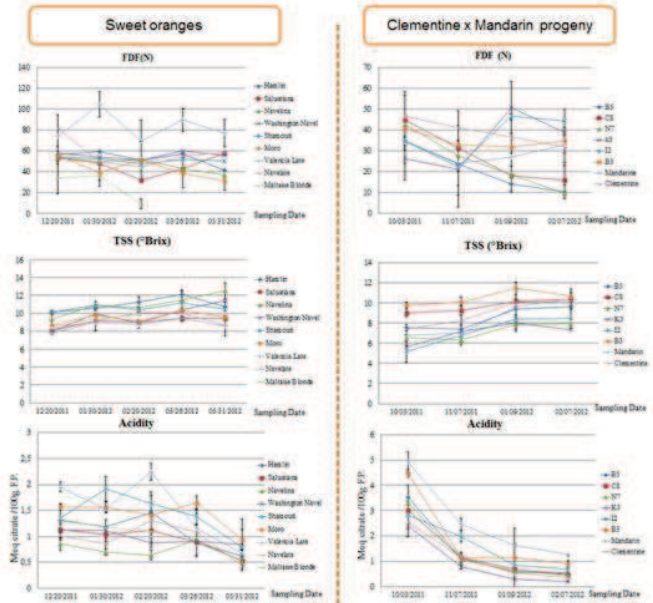


Figure 2. Kinetic of FDF, TSS and acidity evolution during fruit maturation

Table. Pearson's correlation coefficients between FDF and fruit parameters within oranges and Clementine X Mandarin progeny

	Fruit Weight (g)	Peduncle thickness (mm)	% of juice	TSS (°Brix)	pH	Acidity (meq citrate/100g F.P.)	Maturity index	Color index
Oranges	-0.1081	0.1156	-0.0710	-0.1819	-0.0904	0.0535	-0.0648	0.3709
progeny	0.3823	0.2489	-0.0185	-0.0291	0.0623	-0.0522	0.0452	-0.0468

**Conclusion**

The local conditions of Corsica island appear to be unfavorable for fruit abscission for the majority of the sweet oranges, clementine, mandarin and their related hybrids. Fruit abscission is independent of juice sweetness and acidity evolution during fruit maturation. These results demonstrate the significant effect of the environment in abscission and suggest that environmental x genotype interactions control fruit abscission.

Tadeo FR, Simó A, Aguado J, Menéndez Pignatelli DJ, Usach A, Bosc A, Bosc R, Tello M (2007) La abscisión de frutos maduros en naranjos dulces del grupo Navel correlaciona con la acumulación de azúcares en el zumo. Levante Agrícola, 4, 1-7.

---

**Annexe 6. Proceeding accepté par Acta Horticulturae, IHS, Brisbane, Août 2015****Effect of Environment on Citrus Fruit Abscission and Maturation**

H. Khefif<sup>1,2</sup>, FR. Tadeo<sup>3</sup>, R. Selmane<sup>2</sup>, M. Ben Mimoun<sup>2</sup>, R. Morillon<sup>1</sup> and F. Luro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA/CIRAD (UR 'GEQUA'/APMV), 20230 San Giuliano, France,

<sup>2</sup>INAT, 43, Avenue Charles Nicolle 1082 – Mahrajène, Tunis, Tunisia

<sup>3</sup>IVIA- 46113 Moncada, Valencia, Spain

**Keywords:** citrus orange, fruit quality, fruit shedding, climatic data, temperature

**Abstract**

**Fruit shedding is an important cause of citrus fruit loss in different citrus-producing areas in the world. This physiological process can occur in certain citrus varieties during the final stage of fruit maturation. The fruit maturation process interacts with the environment and more precisely with climatic factors such as temperature. The interaction between citrus fruit abscission and climate is not known, as well as the maturity parameters that induce fruit drop. To evaluate the effect of environment on fruit maturation and abscission, a multi-site study was carried out in Spain, Tunisia and Corsica on six orange varieties. The examined parameters were fruit detachment force (FDF), weight, diameter, colour, total soluble sugar (TSS) and titratable acidity (TA). We observed that FDF did not evolve in the same way in the three sites. While in Tunisia and in Spain it decreased, in Corsica, it remained constant throughout the fruit maturation process whatever the orange variety. Variation of temperature and radiation measured between the three sites cannot be the direct factors controlling this fruit process. Moreover, FDF seems not to be dependent on the evolution of any fruit quality parameters. Considering these results, fruit abscission and fruit maturation could be two independent phenomena at least under the environmental conditions in Corsica. Furthermore, we can assess the interaction between genotype, environment and citrus fruit abscission.**

**INTRODUCTION**

Maturation of citrus fruit pulp and peel is characterized by gradual changes in different parameters such as Total soluble content (TSS), titratable acidity (TA), TSS/TA ratio, pulp juice content and peel colour (Iglesias et al., 2007). All of these traits are known to be modified by environmental factors such as temperature (Chelong and Sdoodee, 2013; Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996). Oranges and more specifically those of the Navel group exhibit a tendency to lose their fruits before the harvest period corresponding to the optimal maturity. Although the preharvest drops are frequent in several citrus-producing areas, the environmental effects in this process are still poorly documented. For a deeper understanding of fruit maturation and abscission, the goal of our work was to identify what environmental factors may influence fruit abscission as well as maturation.

**MATERIALS AND METHODS****Plant Material**

Experiments were conducted during the season (2012-2013) in three sites: Spain (Valencia), France (Corsica) and Tunisia (Cap Bon). A total of six orange varieties with different maturity periods were assessed by measuring the fruit-pedicle force detachment (FDF) and fruit quality attributes. The chosen varieties were Navelina, Newhall Navel,

Washington navel, Maltaise demi-sanguine, Lane late and Navelate. Twelve fruits were randomly sampled from each cultivar every month along fruit development from October to April. Orange trees are grafted on citrange Carrizo rootstock in Spain and France and on sour orange in Tunisia.

### **Pedicle-Fruit Retention**

FDF was measured in laboratory using a push-pull force gauge and it expressed in Newton (N).

### **Fruit Quality Attributes**

To follow fruit maturation physical and chemical parameters such as fresh fruit weight, equatorial diameter, peel thickness, color index, firmness, juice percentage, acidity, TSS were measured periodically. Fruit size was recorded with a weighing scale and fruit weight and peel thickness with a caliper. Fruit color was measured through the CIE L\*a\*b system using a Minolta chroma-meter CR 200 (Minolta, Ramsey, NJ). The fruit firmness was measured in Tunisia and France with a digital penetrometer (Agrosta® 14) and in Spain with a texturometer (INSTRON texturometer mod- 3343). The total acidity was determined by titration with 0.1N NaOH and expressed as gram of citric acid by 100 g of fresh juice. The total soluble solids content were determined by digital refractometer and expressed as °Brix.

### **Climatic Data**

Climatic data was collected from meteorological stations located in each orchard. In this work we proceeded to calculate cumulative degree days by using 13°C as the threshold of temperature of vegetative growing (Ladaniya, 2008).

## **RESULT AND DISCUSSION**

### **Fruit Maturation**

In our study, fruits produced in Corsica, in Tunisia and in Spain did not present the same quality by the end of maturation (Table1). Fruit morphological and biochemical characteristics differed depending on the investigated site. In this experiment, in Corsica, orange fruit were heavier than fruit collected in Tunisia. Regarding fruit firmness and peel thickness, no significant difference between varieties cultivated in Tunisia and in Corsica was observed. The fruit rind color index measured in Corsica was higher than in Spain. Orange varieties cultivated under Tunisian and Spanish conditions were similar in juice percentage. However, large differences regarding acidity and sweetness were measured (Table1). In fact, we observed that fruit harvested originating from Corsican orchards were more acid than fruits from Tunisia. Also, fruit collected from Spanish orchards were sweeter than those collected in Corsica (Fig.2, Table1) while Tunisian fruits were characterized by earlier maturity. These observations demonstrate the strong impact of environment on fruit maturation and fruit quality as previously proposed Goldschmidt (2000) and Chelong and Sdoodee (2013).

### **Fruit Abscission**

To understand the influence of environment on fruit detachment force (FDF), we compared data collected from the three sites. Significant differences were observed for FDF of Washington navel depending of the orchards (Fig.1). This is was true for all other varieties

(Data not shown). At an early stage of fruit maturation, 200 days after anthesis, the FDF was higher in Spain than in the two other experimental sites. At the beginning of maturation process which corresponds to 200 days after anthesis, FDF values ranged from 95N to 131 N. However, varieties in Corsica presented the lowest FDF (50 to 68 N). Interestingly, along the maturation, FDF decreased in Spain and in Tunisia but not in Corsica whatever the varieties and whatever their period of maturity. Under Corsican conditions, FDF was quite constant for a quite long period. Even in July, 15 months after anthesis, the FDF was still quite important (40 to 49 N). Meanwhile, by the end of maturation (300 days after anthesis), FDF in Tunisia was below 20 N. For example, the FDF measured in March for the Maltaise demi-sanguine was equal to 9 N (No Data not shown). These results strongly suggested that FDF is also significantly influenced by the environmental factors. Tunisian and Spanish conditions are associated to early fruit abscission and Corsican conditions delayed it.

### **Comparison of Environmental Conditions**

Our finding strongly suggested the consistent effect of the environment on the two processes: maturation and fruit shedding. Environment includes many variables such as climatic factors, rootstocks and soils characteristics. According to Ladaniya (2008), the effect of climatic factors is more predominant than any other factors. In our study, we compared climatic data among sites in order to determine the reasons of the differences in fruit quality and fruit abscission observed among the three sites. During the period of orange abscission in Tunisia and Spain (February to March), temperature was the most variable factor with a great range of variation between Corsica and the two other sites (Fig.3). In Tunisia, average temperatures were higher than those in Spain and in Corsica. Therefore, varieties accumulated more degree-days in Tunisia, while in Corsica, varieties accumulated the lowest degree-days (Fig.3). According to Richardson (2000) and Ladaniya (2008), higher temperatures accelerate the maturation process and decrease fruit acidity. Although the degree-days are an important factor in fruit maturation, this factor did not appear to have a significant impact on fruit abscission. However, a sudden decrease in the number of days showing a temperature lower than 13°C was noticed in Spain and in Tunisia during the abscission period (No data shown). This abrupt decline was not noticed in Corsica. Therefore we may suppose that thermal variation could promote fruit abscission.

### **Did Maturation Have an Effect on Fruit Abscission?**

For Washington navel and the other varieties, there was no difference in the TSS curve shape among sites (Fig.2). In Tunisia, Spain and Corsica, this parameter evolved slowly and in the same way along the maturation. In contrast to the results reported by Tadeo and co-workers (2007) showing that the sugar accumulation in the juice (TSS) was the variable with higher explanatory weight on the evolution of FDF along the fruit maturation period, our results did not reveal any correlation between these parameters. Similarly, coefficient of correlation between all the other fruits quality attributes and FDF were low; inferior to 0.6 (No data shown) suggesting an absence of specific relation between fruit maturation and abscission.

## **CONCLUSION**

The results of this study strongly suggested a great influence of the environment on maturation and abscission. Both fruit quality and fruit attachment force changed depending on the sites. Under Corsican conditions, abscission was not promoted. Temperature was the most variable climatic parameter between the three sites hence the differences in degree-days.

Although, the heat unit accumulated could explain the differences in fruit quality between orchards, this parameter was not a suitable index to explain differences in fruit abscission. However we may suppose that fruit shedding could be associated to the degree of thermal variation measured in February and March. Our results showed also the absence of any correlation between fruit maturation and fruit abscission, and therefore we conclude that fruit abscission seemed to occur independently from fruit maturation.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work is part of Miss Khefifi's PhD who was granted by CIRAD, INRA (France) and the University of Carthage (Tunisia).

## Literature Cited

- Chelong, I. and Sdoodee, S. 2013. Effect of climate variability and degree-day on development, yield and quality of Shogun (*Citrus reticulata* Blanco) in Southern Thailand. *Kasetsart J. (Nat.Sci.)*. 47:333-341.
- Goldschmidt, E.E. 2000. Reassessment of climate effects on fruit maturation in Citrus towards the development of a fruit maturation and quality model. *Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr*: 300-302.
- Iglesias, D.J., Cercós, M., Colmenero-Flores, J.M., Naranjo, M.A., Ríos, G., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Lliso, I., Morillon, R., Tadeo, F.R. and Talon, M. 2007. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiol.* 19 (4): 333-362.
- Ladaniya, S.M. 2008. *Citrus fruit: Biology, technology and evaluation*. Elsevier, USA.
- Richardson, A.C. 2000. Temperature effects on the composition of Satsuma mandarins in New Zealand. *Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr*: 303-307
- Spiegel-Roy, P and Goldschmidt, E.E. 1996. *Biology of Citrus*. Cambridge University Press, UK.
- Tadeo, F.R., Simó A, Agustí, J., Merelo, P., Iglesias, D.J., Usach, A., Boix, A., Buj, A., Bono, R., Talón, M. 2007. La abscisión de frutos maduros en naranjos dulces del grupo Navel correlaciona con la acumulación de azúcares en el zumo. *Levante Agrícola*, 4:1-7.

## Tables

**Table 1.** Fruit parameters measured at mid January in Corsica, Spain and Tunisia

Fruit parameters	Site	Washington navel		Navelina		Maltaise demi sanguine		Newhall navel		Lane late		Navelate	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Fruit weight (g)	Corsica	332.3	41.2	245.6	12.6	225.1	23	213	23	309	50	236.5	31.7
	Spain	294.12	42	248	13.2	-	-	-	-	-	-	239.7	23.4
	Tunisia	226.6	33.2	219.7	10.1	170.6	25.4	197.4	67	209.6	39	-	-
Firmness (Kg/cm <sup>2</sup> )	Corsica	6.8	2.3	6.1	1	5	1	6.4	0.8	6.5	3	6.6	2
	Spain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tunisia	7	0.7	5.4	1	6.5	0.5	7	1	6	1.8	-	-
Colour peel (CCI)	Corsica	38.9	6.2	50.7	5.2	33.5	8.3	73.2	24	28.5	14.4	35.3	5
	Spain	10.1	1.7	16.1	1.8	-	-	-	-	-	-	8.9	1
	Tunisia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Juice percentage (%)	Corsica	29.4	4.4	36.9	2.9	41.5	2	32.9	4.8	4.6	2.8	35.6	3
	Spain	39.4	1.7	36.7	1.6	-	-	-	-	-	-	36.7	3
	Tunisia	40.6	4.3	36.2	3.4	43.4	4.2	47.2	2.5	39.7	3.9	-	-
Acidity (g/100g)	Corsica	0.9	0.3	2.2	0.7	2.1	0.6	1.5	0.5	1.7	0.3	1.6	0.1
	Spain	1.3	0.4	1.5	0.3	-	-	-	-	-	-	1.1	0.1
	Tunisia	0.6	0.09	0.4	0.08	0.9	0.1	0.6	0.1	0.6	0.1	-	-
TSS (°Brix)	Corsica	8.6	0.6	10.3	1.1	9.9	0.4	10	1	7.5	0.4	8	0.7
	Spain	12	0.7	13.4	0.3	-	-	-	-	-	-	12.8	0.8
	Tunisia	11.2	0.5	11	1	9.6	0.5	9.5	0.4	10.3	0.5	-	-
Maturity index	Corsica	8.6	2	4.7	1.1	5.4	2	7.3	3.2	5.4	1.3	5.8	2.2
	Spain	8	1	9.2	1.9	-	-	-	-	-	-	11	1.2
	Tunisia	16.7	2.4	27.7	7.2	9.9	1	12.7	3.6	15.2	2.9	-	-

SD:Standard Error

(-) No data

## Figures

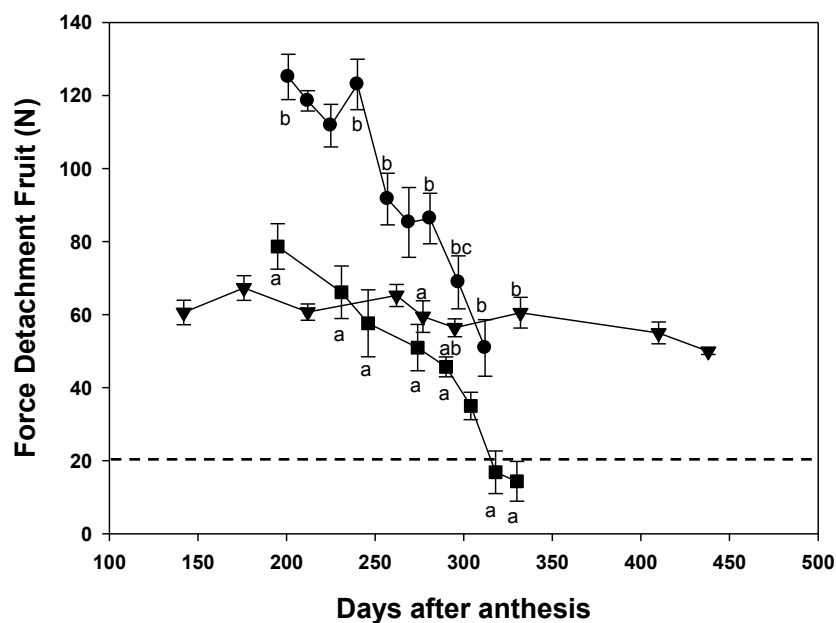


Fig. 1. Kinetics of FDF during maturation for Washington Navel in Corsica (▼), Spain (●) and Tunisia (■). Each point represents the mean value of twelve samples and vertical bars correspond to SE. Anthesis occurred the second and the fourth week of April /2012 respectively in Tunisia, Spain and Corsica. The Fruit-drop threshold is approximate and refers only to values of FDF close to the fruit abscission.



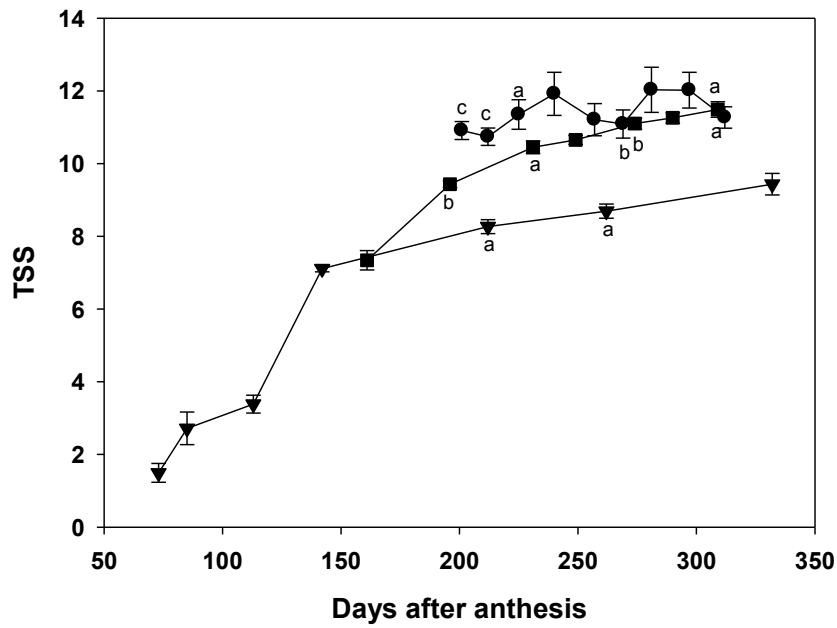


Fig.2. Kinetics of TSS along fruit maturation for Washington navel in Corsica (▼), Spain (●) and Tunisia (■). Each point represents the mean value of twelve samples and vertical bars correspond to standard error. Anthesis occurred in the first, the second and the fourth week of April /2012 respectively in Tunisia, Spain and Corsica.

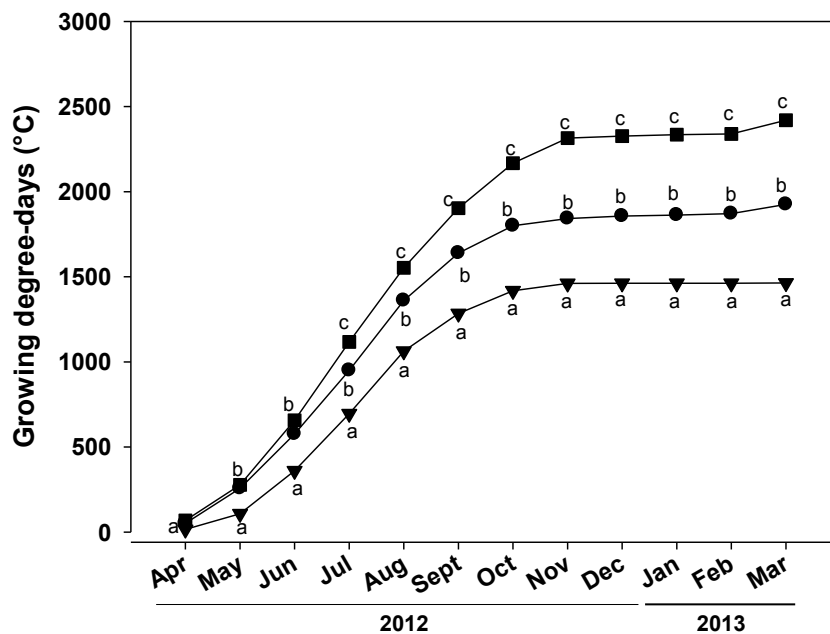


Fig.3. Cumulated degree-days from April 2012 (period of anthesis) until Marsh 2013 in Corsica (▼), Spain (●) and Tunisia (■).