

23 juin 2022



## Gérer les émergences du Huanglongbing, maladie vectée des agrumes : apports de l'épidémiologie

Virginie Ravigné – UMR PHIM



# Le HLB

- HLB = Huanglongbing = *greening* des agrumes
- Trois espèces bactériennes non cultivables *Candidatus* Liberibacter africanus, americanus, asiaticus spécifiques des agrumes
- Transmises par au moins deux espèces de psylles piqueurs-suçeurs sur un mode circulant multipliant
- Maladie considérée comme la pire contrainte pesant sur les agrumes
  - ✓ Depuis son arrivée en **Floride** (2005) réduction de 75% de la production, 80% des usines à jus et doublement des coûts de production (USDA, 2021). Pertes estimées à 1 milliard US\$ par an sur les 5 dernières années.



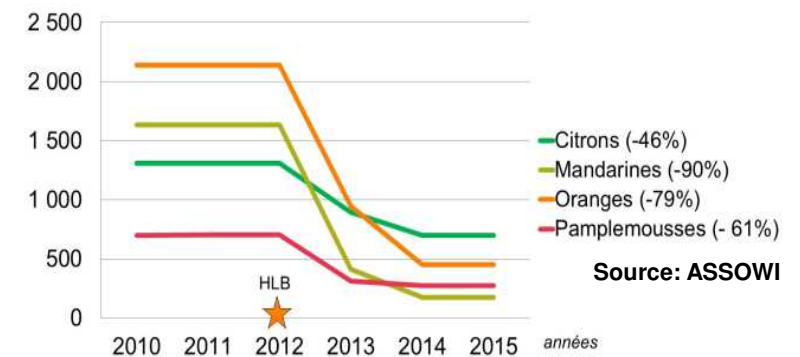
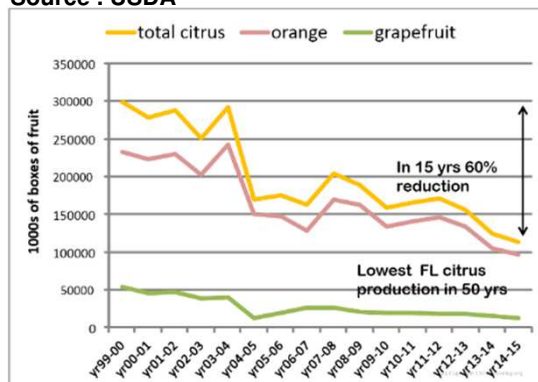
*Diaphorina citri*



*Trioza erytreae*

- ✓ Après la découverte de la maladie en **Guadeloupe** en 2012 (Cellier et al. 2014) destruction de 75% des arbres des 5 plus grosses pépinières de l'île. Pertes de production de 70%.

Source : USDA

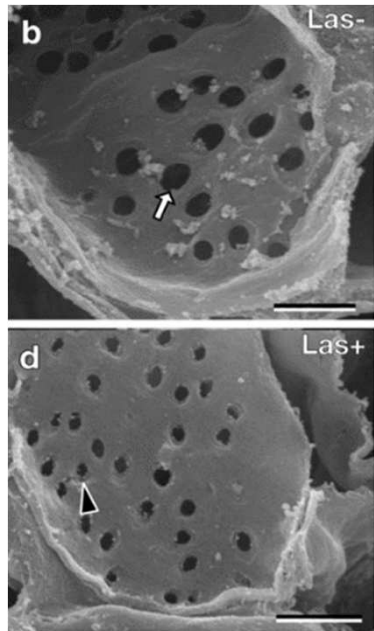


Source: ASSOWI

# Les symptômes induits par le HLB

Niveau physiologique

Synthèse de callose  
(*Koh et al., 2012*)



Niveau foliaire  
(*Weir, 2003*)

Marbrures asymétriques



Niveau fruit  
(*Bassanezi et al., 2009*)

Externe



Interne



Niveau racinaire

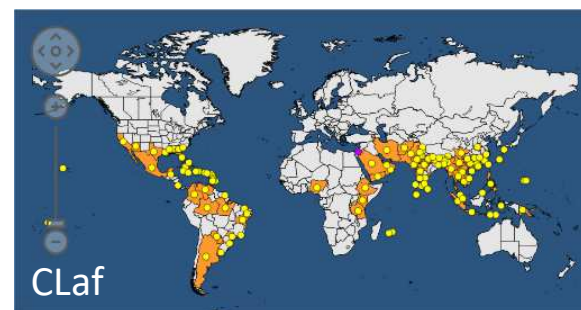
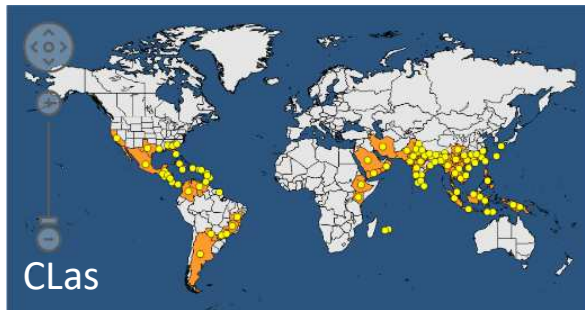
Colonisation et destruction des racines  
(*Johnson et al., 2013; Kumar et al., 2018*)



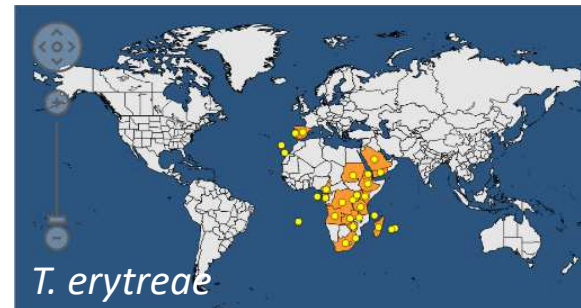
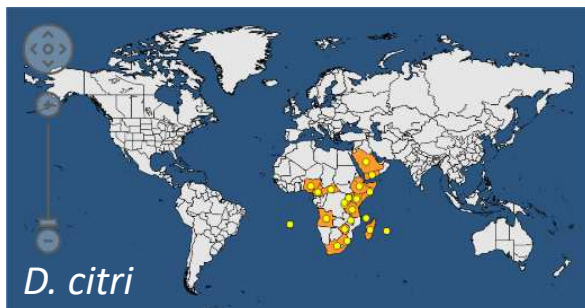
DÉPÉRISSEMENT / MORT

## Distribution et problématique

- Maladie présente dans les principales zones de production hors bassin méditerranéen
- A ravagé les agrumes de Guadeloupe (2012), Martinique (2013) et se propage actuellement à la Réunion (2015)



- Des populations de *T. erytrae* (vecteur du HLB) installées dans la péninsule ibérique
- Détection de *D. citri* en Guyane (vecteur du HLB) et en Israël en 2021



Nécessité d'une surveillance épidémiologique efficace

# Le défi de la surveillance

- Système complexe
  - Trois bactéries
  - Deux psylles au moins (Sauvion 2019)
  - Des parasitoïdes des psylles
  - Des hôtes non agrumes réservoirs des psylles mais pas de la maladie (*Murraya paniculata*, buis de Chine)
- Les symptômes ne sont ni sensibles ni spécifiques
  - Incubation courte + phase asymptomatique longue (2 ans)
  - Symptômes ressemblant à des déficits hydriques ou nutritionnels
- Le statut des arbres ne peut être obtenu qu'au prix d'un test moléculaire
  - Actuellement méthode officielle RT-PCR
  - Méthodes alternatives toutes coûteuses (LAMP-PCR, olfaction canine)



*Murraya paniculata*

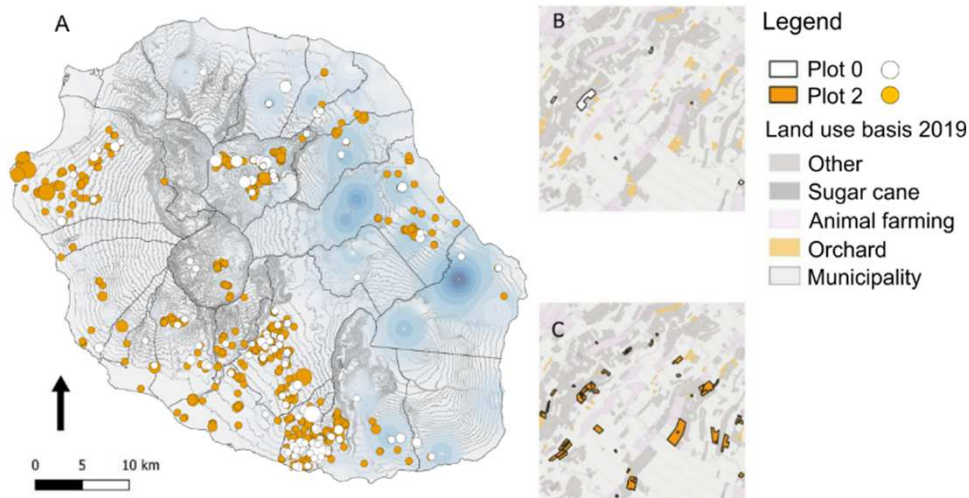


→ Optimiser la surveillance

# Vers une surveillance basée sur le risque : leçons de la Réunion

Hypothèse : la propagation épidémique est contrainte par la structure du paysage agricole et les facteurs éco-climatiques

## 1- Améliorer la connaissance du parcellaire agrumicole



Houillon et al. en révision

74 ha en 2016 → 294 ha en 2021

# Vers une surveillance basée sur le risque : leçons de la Réunion

Hypothèse : la propagation épidémique est contrainte par la structure du paysage agricole et les facteurs éco-climatiques

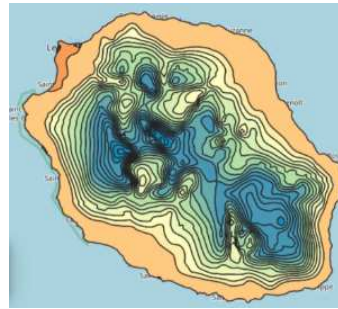
1- Améliorer la connaissance du parcellaire agrumicole

2- Rassembler des données écologiques, pédologiques et climatiques

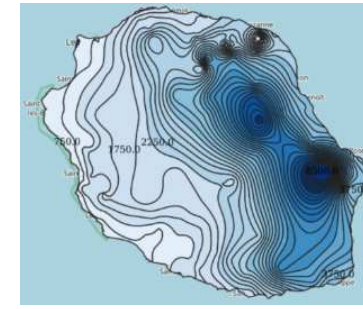
Altitude



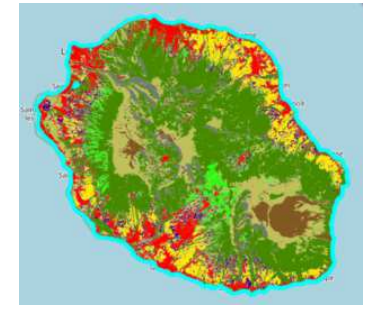
Température



Pluviométrie



Usage du sol

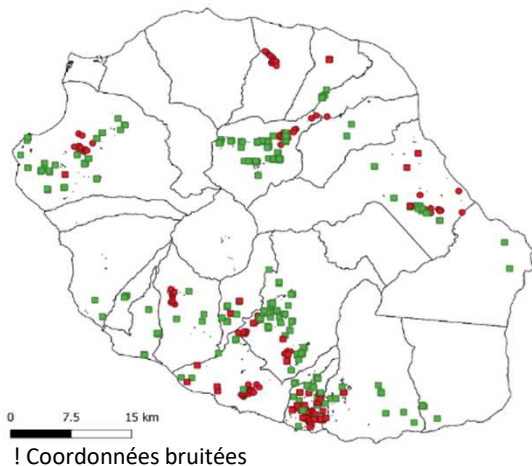


Données de l'atlas en ligne AWARE Cirad, Dupuy & Gaetano 2019

# Vers une surveillance basée sur le risque : leçons de la Réunion

Hypothèse : la propagation épidémique est contrainte par la structure du paysage agricole et les facteurs éco-climatiques

- 1- Améliorer la connaissance du parcellaire agrumicole
- 2- Rassembler des données écologiques, pédologiques et climatiques
- 3- Assembler et nettoyer des données épidémiologiques



- Surveillance officielle (DAAF – FDGDON – ANSES)
  - ✓ 60 arbres/ha par pools de 10. PCR jusque mi 2020 puis RT-PCR
- Mesures de prévalence dans les jardins (DAAF – CIRAD)
  - ✓ 8 quartier résidentiel x 28 arbres par quartier
- Echantillonnages recherche en parallèle de la surveillance officielle (CIRAD)
  - ✓ Arbre par arbre. Q-PCR.

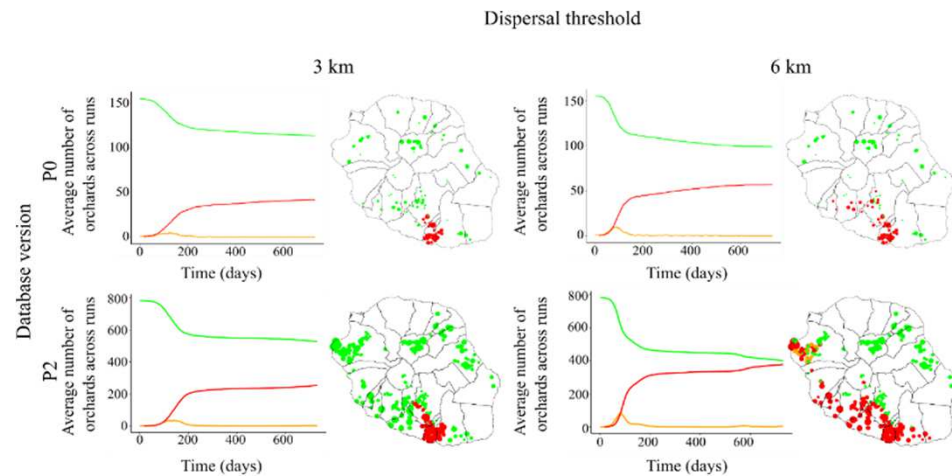
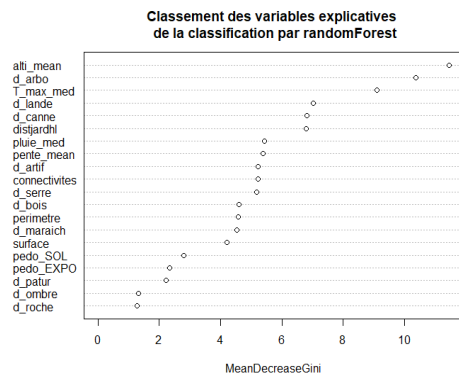
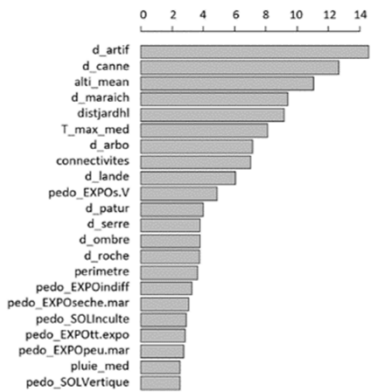


# Vers une surveillance basée sur le risque : leçons de la Réunion

Hypothèse : la propagation épidémique est contrainte par la structure du paysage agricole et les facteurs éco-climatiques

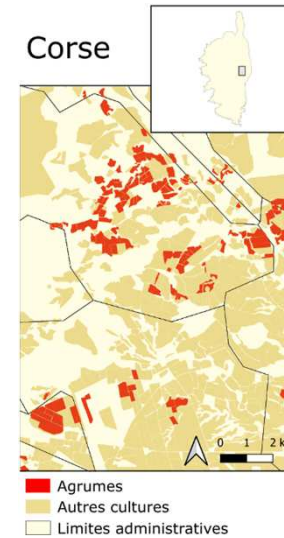
- 1- Améliorer la connaissance du parcellaire agrumicole
- 2- Rassembler des données écologiques, pédologiques et climatiques
- 3- Assembler et nettoyer des données épidémiologiques
- 4- Mettre en relation présence/absence de maladie et variables de contexte

- Approches GLM et apprentissage automatique (SVM et Random forests)
- Simulations épidémiologiques



# Et pour d'autres territoires

- Adapter les protocoles de prélèvement au caractère asymptomatique de la maladie
  - ✓ Pas de reconnaissance visuelle
  - ✓ Echantillonnage de nombreux arbres poolés
- Choix des parcelles basé sur le risque
  - ✓ Altitude/températures
  - ✓ Structure du parcellaire agrumicole
  - ✓ Inférence du risque en Corse et en Occitanie



Epidémiologie  
Santé Végétale

CULTIVER  
PROTÉGER  
*autrement*

## Projet BEYOND (C. Morris & S. Soubeyrand)

Building epidemiological surveillance & prophylaxis  
with observations near & distant

POST-DOC NEEDED !!

- Caractérisation du rôle des communautés microbiennes associées aux agrumes lors des infections au HLB





# Remerciements

Corentin Exbrayat, Camille  
Guilloteau, Marine Weishaar,  
Nathan Créquy, Rhianna  
McAneny

Thèse ANSES – CIRAD – INRA  
Ismaël Houillon



**DAAF**  
Alexandre Coddeville  
Bruno Debenay  
François Letoublon

**Chambre d'agriculture**  
Guillaume Maratchia



**FDGDON**  
Estelle Roux  
Romuald Fontaine  
Equipes de terrain et labo



**Cirad - PVBMT**  
Fred Chiroleu  
Anna Doizy  
Karine Boyer  
Olivier Pruvost  
Arthur Bailly  
Hugo Santacreu  
Marc-Antoine Sihou  
Bernard Reynaud  
François Hervy  
Samuel Nibouche  
Maeva Vinot



**ANSES - RAPT**  
Aude Chabirand  
Gilles Cellier  
Bruno Hostachy  
  
**ANSES - EAV**  
Pauline de Jerphanion



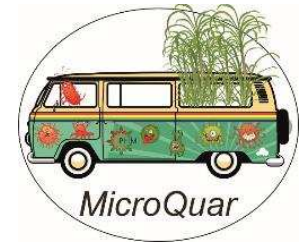
**Cirad - ASTRE**  
Annelise Tran

**Cirad – TETIS**  
Stéphane Dupuy  
Pascal Degenne  
Danny Lo Seen

**Cirad – AIDA**  
Lionel Le Mézo



**Inrae**  
Benoit Facon  
Samuel Soubeyrand



Hervé Sanguin  
Frédéric Mahé



# Gérer les émergences du Huanglongbing, maladie vectée des agrumes : apports de l'amélioration variétale



Raphaël Morillon – UMR AGAP

23 juin 2022



Animation RIVOC Risques vectoriels et vecteurs :  
liens et synergies entre les régions Corse et  
Occitanie



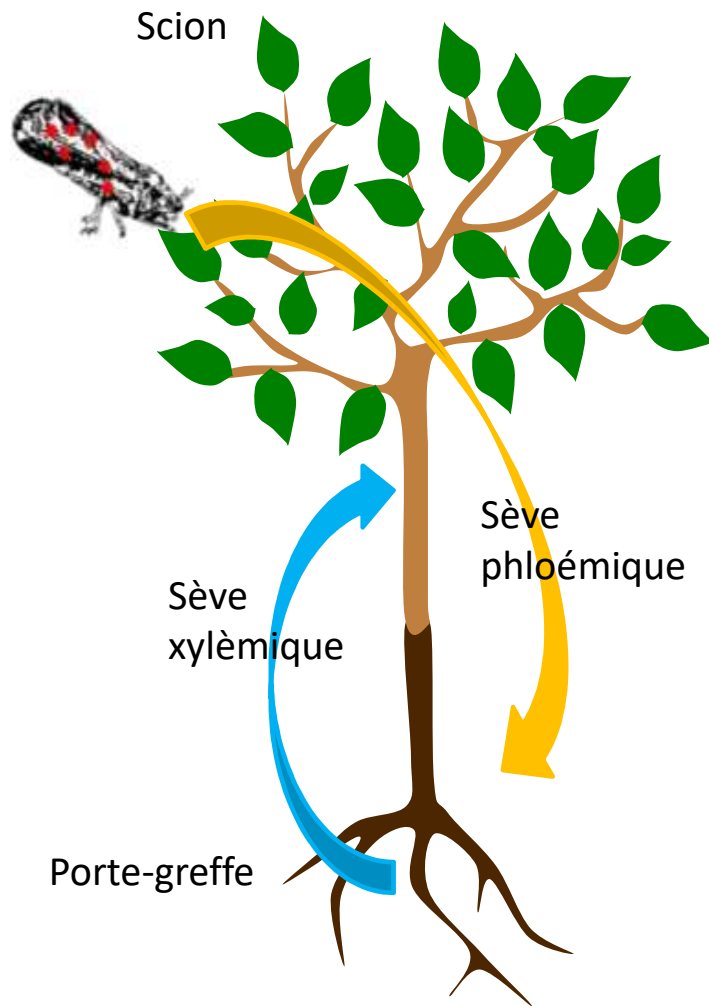
# Les stratégies de lutte contre la maladie : deux stratégies principales

Éradiquer la maladie sur de grands bassins de production et empêcher la re-contamination	Produire de façon durable en présence de la maladie
Brésil, Cuba	Floride, Asie, Antilles Françaises
Replantation uniquement sur des zones sans agrumes ni apparentés	Replantation sur des zones contaminées
Arrachage continu de tous les arbres contaminés + traitement chimique systématique sur une distance de 100 m	Présence d'agrumes contaminés et d'apparentés favorisant les populations de psylles
Schémas de certification et production de plants sains	
Suivi de la présence des psylles	
Lutte chimique contre les vecteurs: traitement dès l'observation d'un psylle (jusqu'à 11 traitements /an)	Lutte biologique contre le vecteur
Matériel végétal résistant au HLB	
Matériel végétal plus tolérant au HLB	
Pratiques culturales (en particulier nutrition et irrigation) et haute densité	

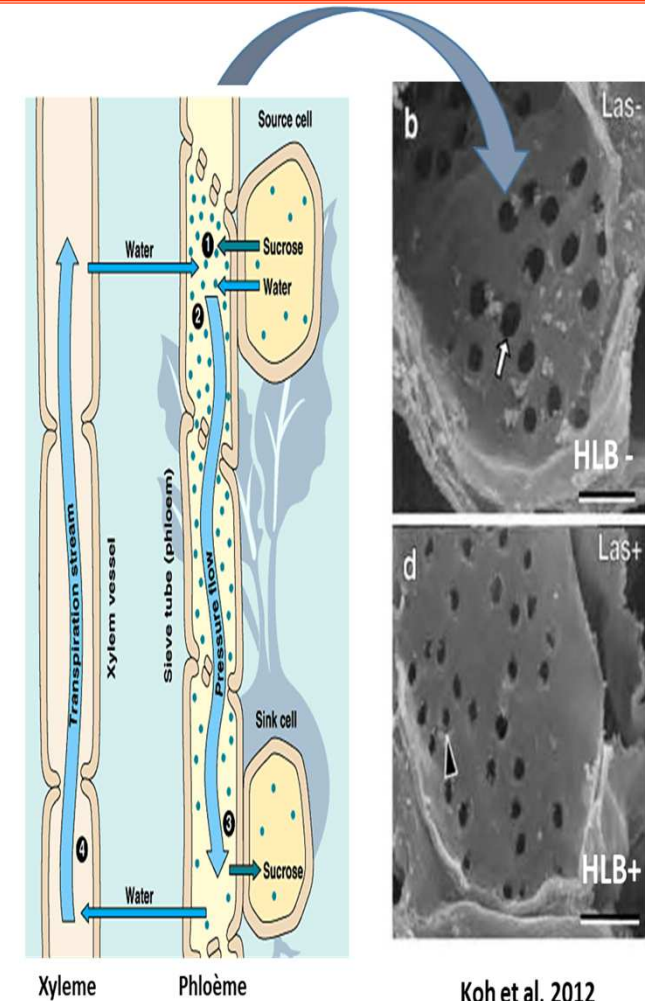
THE 10 COMMANDMENTS AGAINST HLB



# Dynamique de l'infection dans la plante et Impact physiologique de la maladie du HLB



- Synthèse de callose au niveau des cellules du phloème:  
⇒ *obturation des cribles des parois entre cellules.*
- Accumulation de l'amidon et des sucres dans les feuilles  
⇒ *symptômes foliaires*
- ⇒ *Les racines et les fruits ne sont plus alimentés en sève élaborée*
- Il y a destruction du système racinaire
- Recherche de porte-greffes et variétés de scions limitant le développement de la bactérie.



# Variabilité de la sensibilité au niveau du germoplasme; Les éléments bibliographiques et perspectives pour la lutte contre le HLB

## ☐ Genres *Citrus* et *Poncirus*

- Pas de résistance vraie

Variabilité de la susceptibilité

- Orangelo Triumph / Pomelos
  - Intérêt de l'ancêtre Cédratier
  - *Poncirus*: résultats contradictoires
- 
- Effet favorable de la polyploïdie
    - Limettier Tahiti (3x) versus limettiers diploïdes
    - Porte-greffes tétraploïdes (sélection USA)



**Vivre avec la maladie :  
Recherche de variétés plus tolérantes**



**Eradiquer la maladie (variétés résistantes)  
Vivre avec la maladie (porte-greffe résistants)**

## ☐ Genres *apparentés*

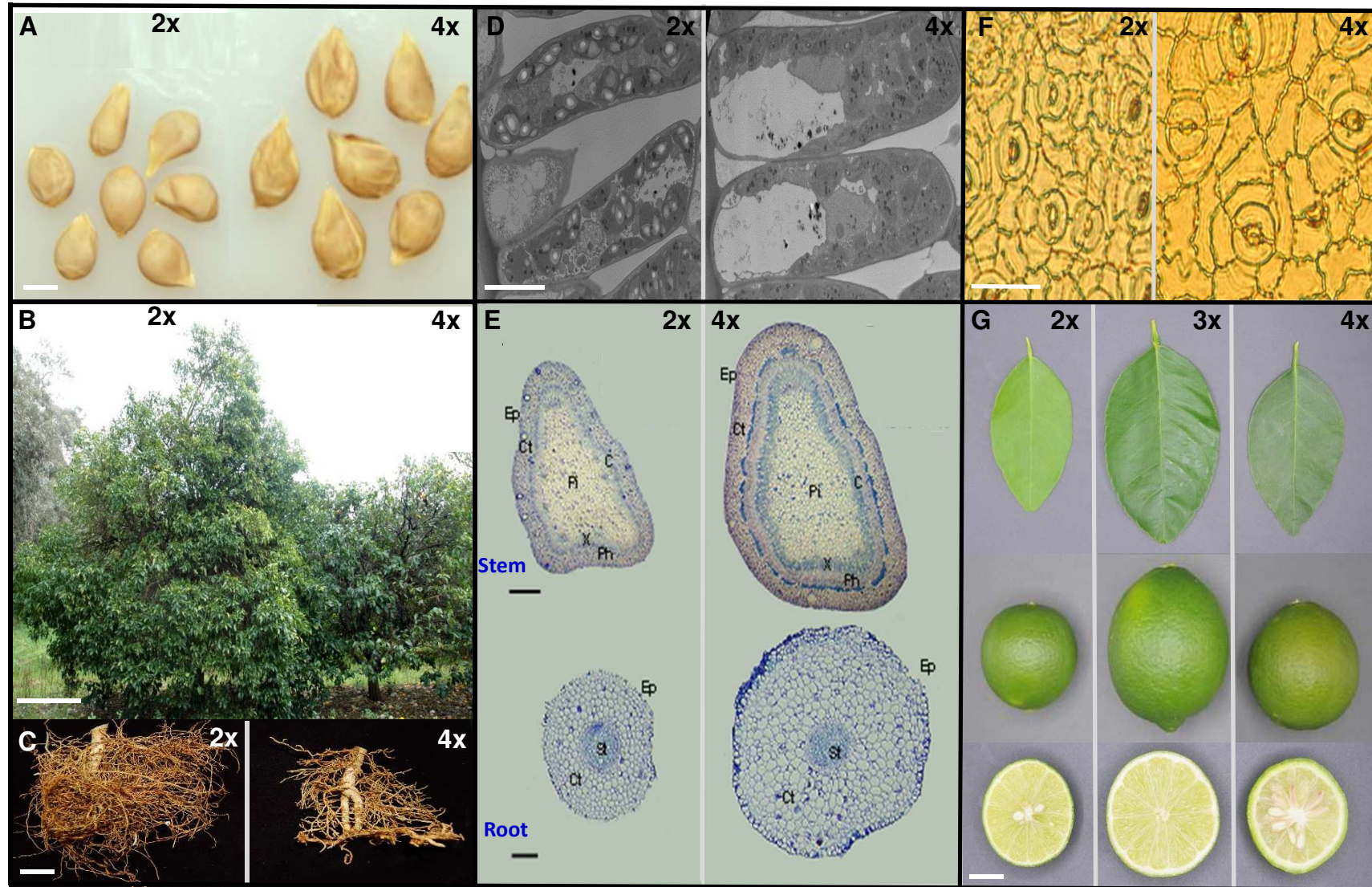
- Résistances vraies (absence de multiplication de la bactérie) dans les genres australiens *Microcitrus* et *Eremocitrus*, sexuellement compatibles avec les espèces cultivées du genre *Citrus*
- Résistances vraies dans des genres apparentés sexuellement incompatibles



# Différenciations phénotypiques et physiologiques induites par la polyploïdie

La polyploïdie conduit à:

- Effet nanisant chez l'arbre,
- Augmentation de la taille des organes,
- Augmentation de la taille cellulaire.
- Meilleure tolérance aux stress abiotiques (déficit hydrique, stress salin, froid)



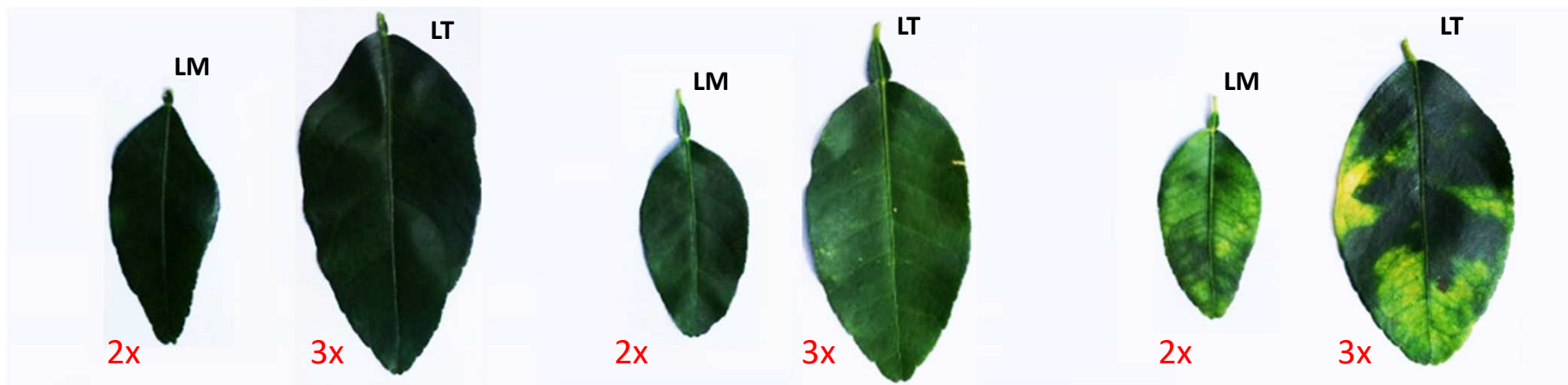


# ***Evaluation physiologique de feuilles de limettiers Mexicain (2x) et Tahiti (3x) infectés ou non par le HLB***

## ➤ Matériel végétal :

- Limettier Mexicain (LM 2x): *Citrus aurantiifolia*
- Limettier Tahiti (LT 3x): *Citrus latifolia* (issu d'un croisement entre un limettier Mexicain et un citronnier)
- Variétés greffées sur du Citrumelo 4475 (2x) (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*)

**Existe-il une relation entre les phénotypes foliaires et la tolérance au HLB: quel est l'impact de la polyploïdie ?**



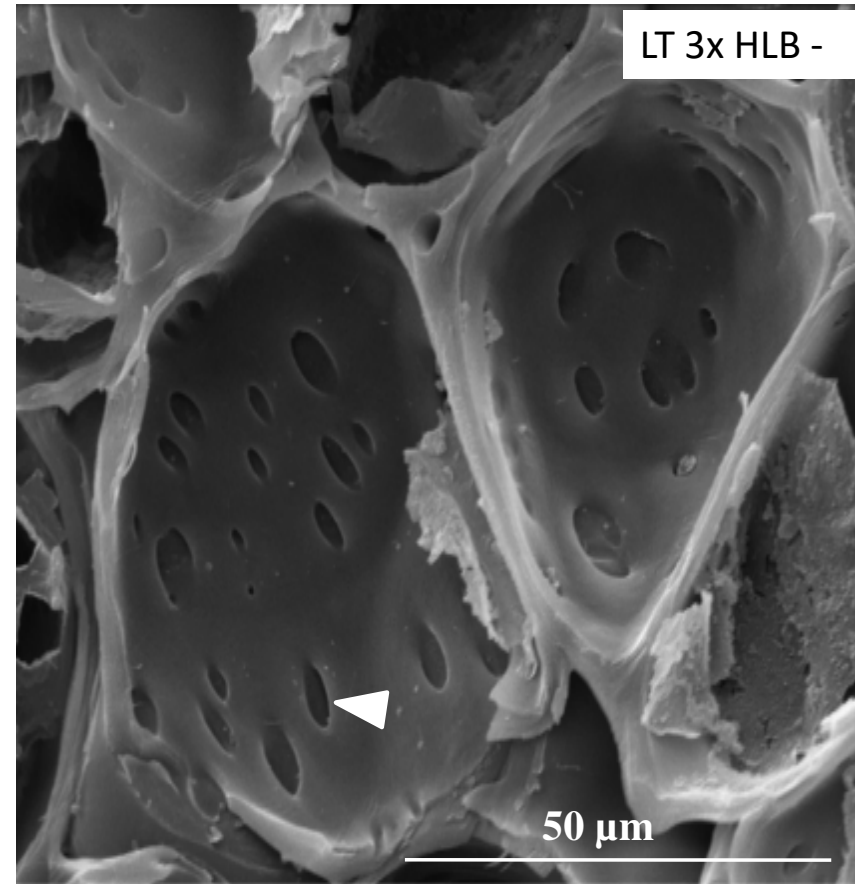
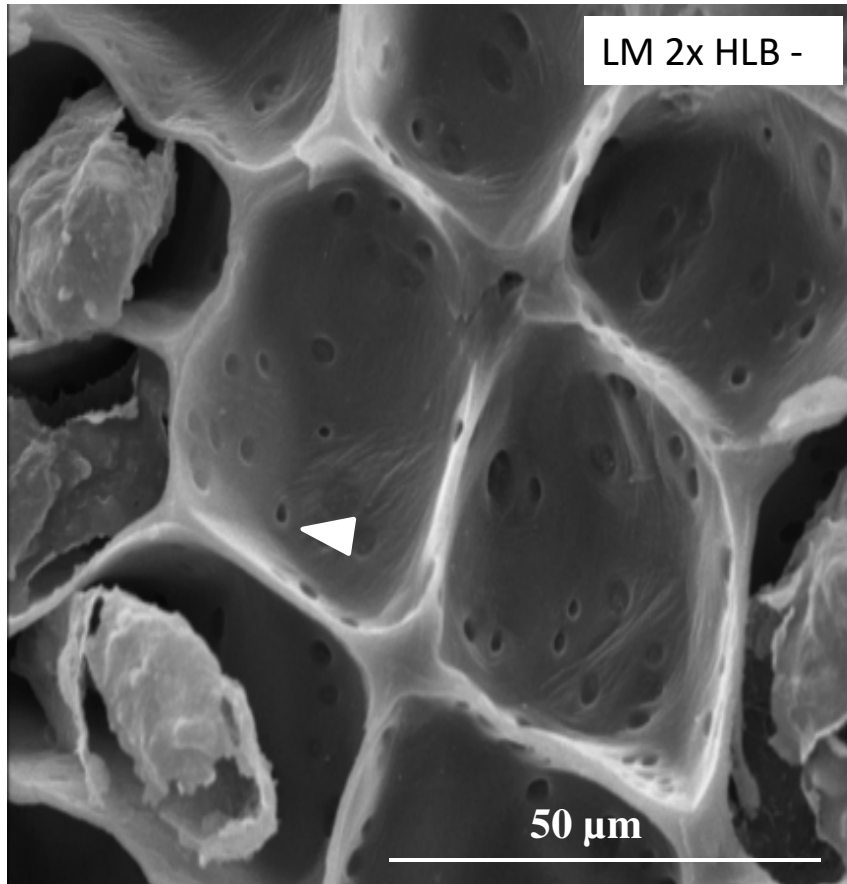
Feuilles témoins

Feuilles infectées asymptomatiques, Las+AS

Feuilles infectées symptomatiques, Las+S

# Observation du phloème de pétioles de limettiers Mexicain (2x) et Tahiti (3x)

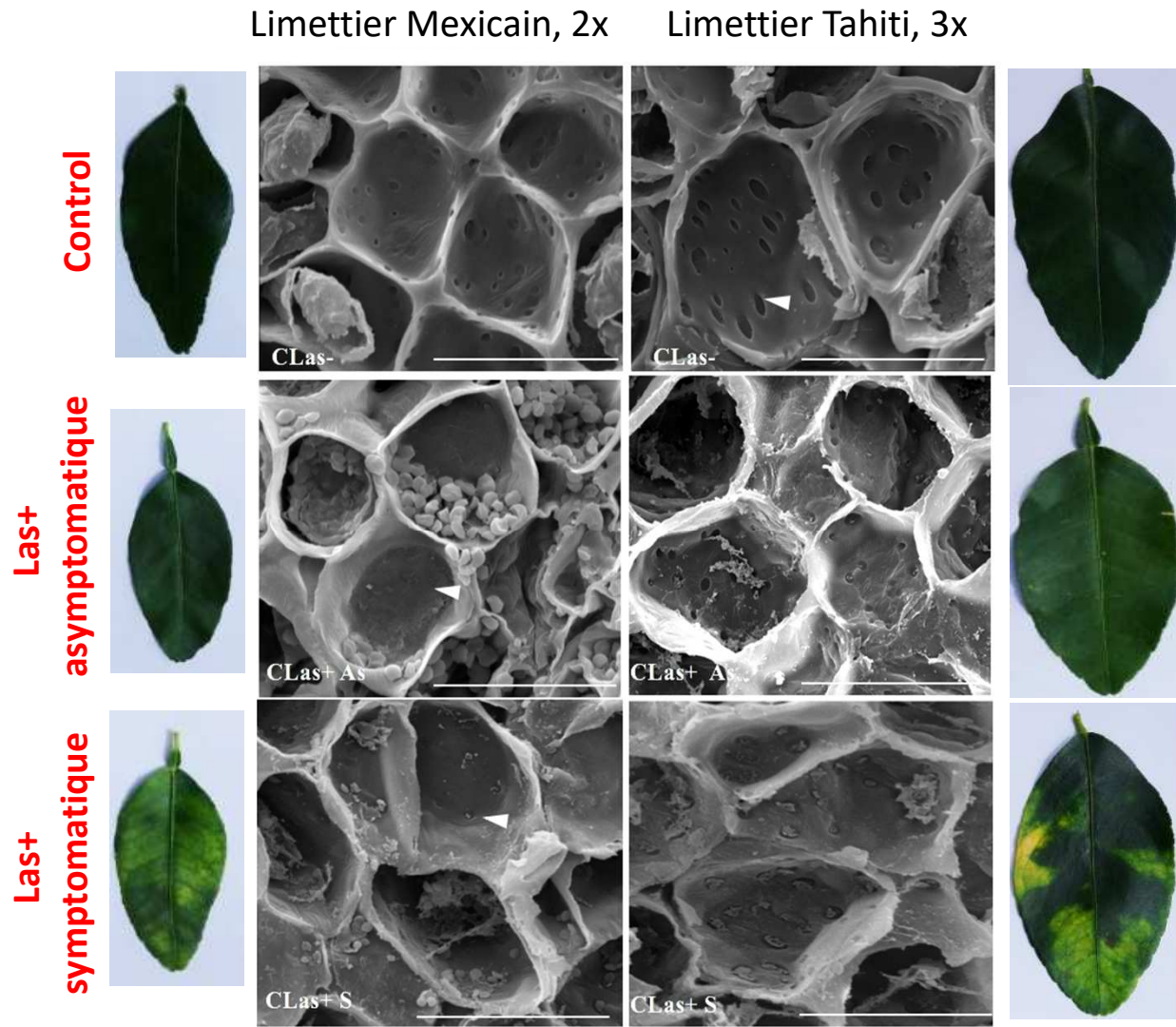
Microscopie électronique à balayage (MEB) du phloème de pétioles de feuilles témoins



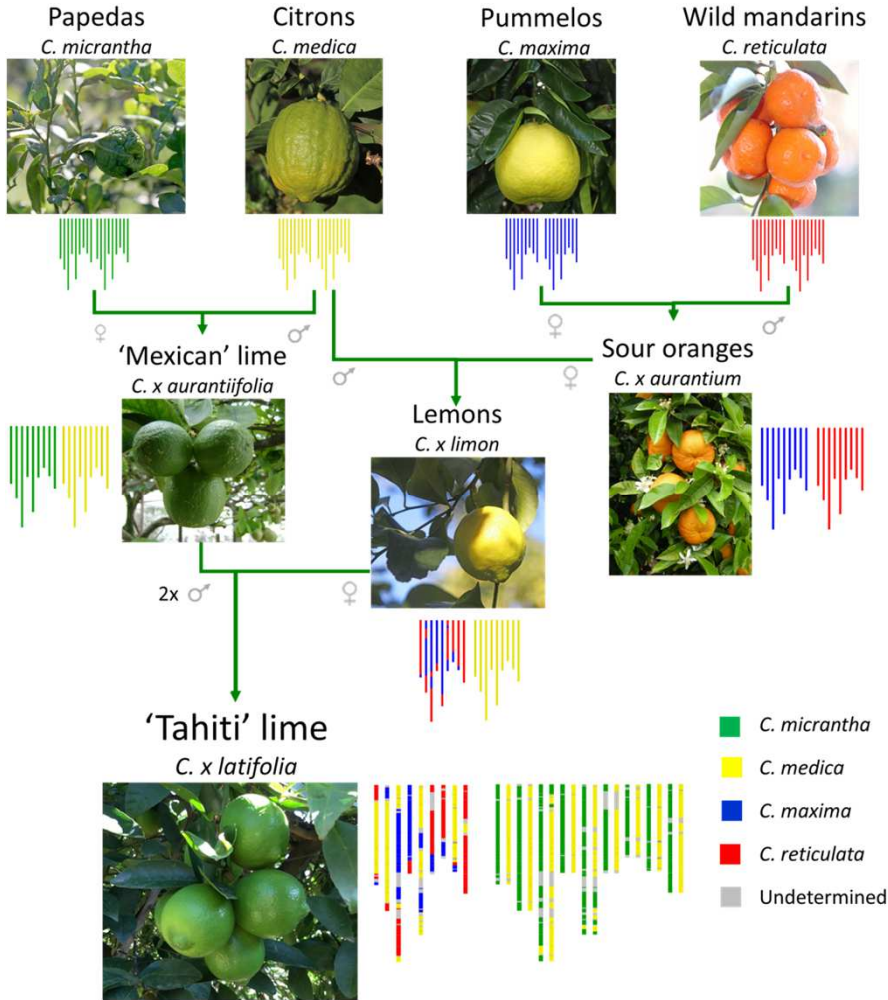
Taille cellulaire des LT > LM  
Pas de présence de callose

# Quels résultats aux stades asymptomatiques et symptomatiques ?

*L'impact de la maladie est plus marqué pour LM que pour LT dès le stade Las+ asymptotique*



# Population de limettiers triploïdes hybrides : Création de la population



Stratégie de reconstruction du limettier Tahiti basée sur la phylogénomie

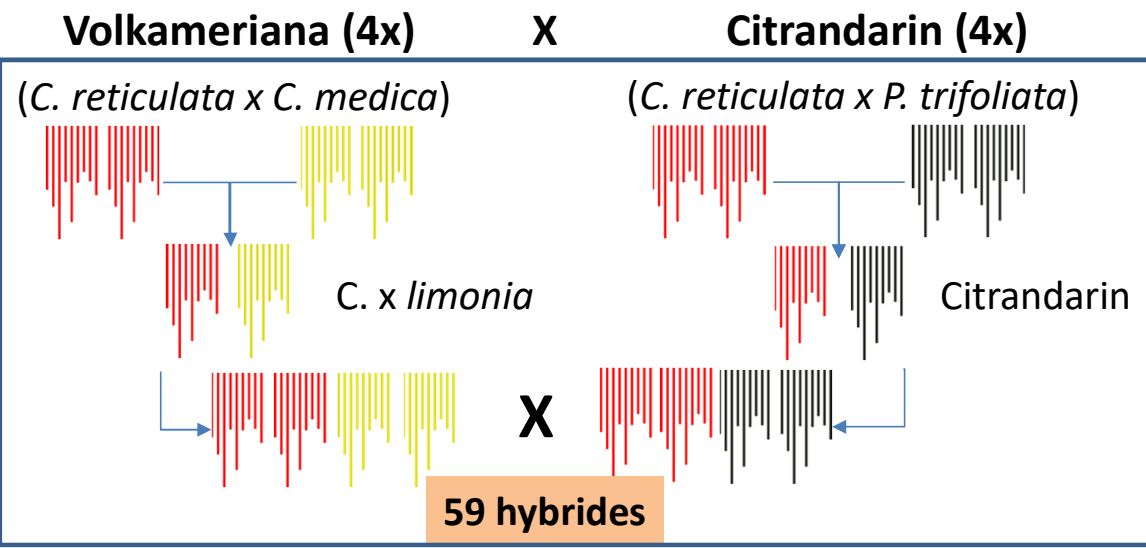
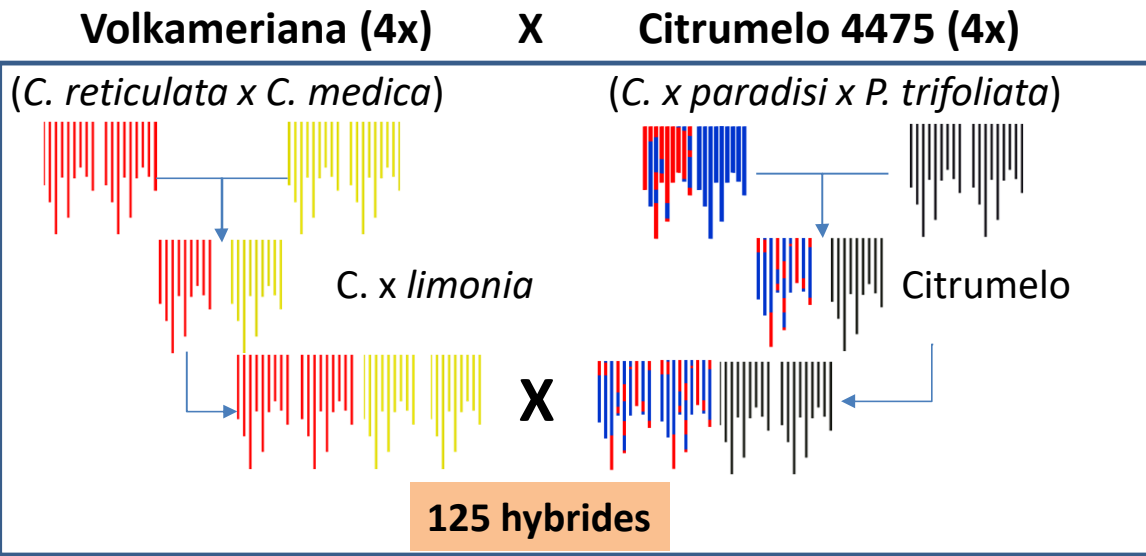
Objectifs de diversification des limettiers :

- Tolérance aux maladies (HLB en particulier...)
- Floraison et fructification toute l'année pour une alimentation continue du marché local.
- Faible teneur en Furanocoumarine.



Parcelle de Limettiers triploïdes hybrides en évaluation pour les caractères d'intérêt

# Populations de porte-greffes tétraploïdes hybrides : Création de la population



Trois parents tétraploïdes issus du doublement chromosomique d'hybrides diploïdes d'origine inter-spécifique ou inter-générique.



Populations porte-greffes 4x en amplification par bouturage

# Exploitation du compartiment océanien du complexe d'espèces pour la résistance au HLB

## Développement de ressources biologiques

### ☐ Hybridations sexuées inter-génériques

- Population d'hybrides inter-génériques de seconde ou troisième génération (fécondations libres) disponible en Guadeloupe (plus de 600 hybrides origine Seapag-Corse)
  - Hybridations sexuées contrôlées (Corse puis évaluation Guadeloupe)
    - Breeding variétal : hybridations F1 et BC1 entre mandariniers et *Microcitrus*
    - Breeding de porte-greffes: hybridations Eremorange x (*Citrus x Poncirus*)  
Eremorange = *Eremocitrus glauca* x *C. sinensis* ; *E. glauca* résistant au HLB et très résistant au stress hydrique
- ➔
- Génotypage GBS et phénotypage pour la résistance au HLB
  - Carte génétique et études des recombinaisons intergénériques
  - Etudes GWAS et QTLs de la résistance au HLB et recherche de gènes candidats chez les genres *Microcitrus* et *Eremocitrus*



### ☐ Hybridations Somatiques (Montpellier puis évaluation Guadeloupe)

- Breeding porte-greffes : (*Citrus x Poncirus*) + Eremorange
- Pre-breeding géniteurs tétraploïdes: *Citrus* + Océaniens  
Stage Gabriel Boulard

# CONCLUSIONS

---

- ❑ Le HLB est aujourd'hui la principale contrainte de l'agrumiculture tropicale et subtropicale et menace le Bassin Méditerranéen.
- ❑ La variabilité de la sensibilité au HLB au sein des agrumes cultivés permet de sélectionner des variétés et porte-greffes mieux adaptés pour une production durable sous contrainte de la maladie.
- ❑ La polyploïdie apparait favorable grâce à un système de détoxification plus efficace, une anatomie vasculaire moins impactée par les dépôts de callose induits par le HLB et une meilleure réponse physiologique à la maladie.
- ❑ La mise en évidence de résistances vraies au sein des genres apparentés des agrumes océaniques ouvre de nouvelles perspectives pour la lutte contre le HLB, en s'appuyant sur la création de ressources biologiques et moléculaires innovantes ainsi que sur l'expertise d'AGAP concernant la structure et le fonctionnement des génomes complexes.

# Projets et soutiens financiers

## Projets Européens:



## Projets Européens + Régions:



## Projets nationaux:



Dynamo



Genome Harvest

## Partenaires Privés:





# Merci pour votre attention

## SEAPAG Guadeloupe

Saturnin Bruyere  
Rosiane Boisne-Noc  
Omer Calvados  
Alexis Dereeper  
Barbara Hufnagel  
Will Latrournald

## Doctorants

Lény Calvez  
Gary Sivager

## SEAPAG Martinique

Claire Amar  
Eric Chiffrin  
Cathy Mievilly

## SEAPAG Montpellier

Dominique Dambier  
Pascal Barantin  
Jean Charles Evrard  
Fabienne Micheli  
Maëva Miranda  
Raphaël Morillon  
Patrick Ollitrault

## SEAPAG Corse

Yann Freelicher

Cécile Morillon

Le Huanglongbing,  
la maladie des agrumes



<https://cavalbio.cirad.fr/>