

Apport de l'hybridation somatique pour l'exploitation des ressources génétiques des agrumes

Patrick Ollitrault, Dominique Dambier, Yann Froelicher, Françoise Carreel, Angélique d'Hont, François Luro, Saturnin Bruyère, Cécile Cabasson, Samia Lotfy, Ali Joumaa, Fanny Vanel, Franck Maddi, Karine Treanton, Michel Grisoni

Médiatisée à la fin des années 70 avec les hybrides pomme de terre/tomate [1], l'hybridation somatique constitue aujourd'hui une composante importante des programmes d'amélioration de plusieurs complexes d'espèces. Elle permet en effet d'introgesser des gènes provenant d'espèces sexuellement incompatibles ou de génotypes stériles en élargissant d'autant le domaine des ressources génétiques utilisables [2-4]. Cette technique est particulièrement précieuse pour gérer la diversité au sein de pool géniques polyploïdes. Ainsi de nombreux travaux ont porté sur le complexe d'espèces de la pomme de terre [5-7] ou celui des *Brassica* [8, 9]. L'hybridation somatique a également été appliquée avec succès pour introgresser des caractères ponctuels d'espèces sauvages *via* des méthodes de fusions asymétriques où les protoplastes

de l'espèce sauvage sont irradiés par des rayons gamma ou soumis à des traitements UV [10] afin de provoquer une fragmentation et une élimination de la plupart des chromosomes, ce qui permet la recombinaison de fragments chromosomiques dans le génome de l'espèce cultivée [7, 11, 12]. Cette technique a prouvé son efficacité, couplée à des pressions de sélection *in vitro*, en permettant par exemple le transfert de résistances au méthotrexate et au 5-méthyl-tryptophane de la carotte chez le tabac [12], de la résistance à *Phoma linguam* de *Brassica juncea*, *Brassica carinata* et *Brassica nigra* chez *Brassica napus* [13] ou de la résistance au virus de la mosaïque du tabac de *Nicotiana repanda* chez *Nicotiana tabacum* [14]. L'intérêt de l'hybridation somatique ne se limite d'ailleurs pas à la gestion des génomes nucléaires. Différents travaux visent en effet à associer les noyaux d'une espèce aux organites cytoplasmiques d'autres espèces, principalement pour la recherche de stérilités mâles nucléo-cytoplasmiques mais également afin de transférer certains caractères de résistance à déterminisme cytoplasmique [15-21]. Ces alloplastes sont généralement générés dans le cadre d'hybridations asymétriques où les protoplastes de l'un des parents sont irradiés à des doses élevées afin de détruire les noyaux tandis que les protoplastes de l'autre parent sont traités à l'iodoacétate pour inactiver les organites cytoplasmiques [20-24]. Les hybridations somatiques peuvent également déboucher sur des recombinaisons des génomes cytoplasmiques. Ces cybrides concernent principalement les génomes mitochon-

driaux [25-28] et seuls quelques très rares cas de recombinaisons chloroplastiques ont été publiés [29, 30]. La *figure 1* schématise les différentes structures génétiques pouvant être générées par l'hybridation somatique.

Les agrumes constituent une bonne illustration de l'intérêt de l'hybridation somatique pour l'exploitation des ressources génétiques. La première production fruitière mondiale est confrontée à des pressions biotiques et abiotiques croissantes et à une segmentation des marchés qui conduisent de nombreux pays producteurs à développer des programmes de création variétale. Les stratégies d'amélioration conventionnelle sont limitées par les particularités du système de reproduction, par l'organisation évolutive des agrumes et par la longueur de la phase juvénile (5 à 6 ans) qui hypothèquent grandement la mise en place de schémas de recombinaisons sur plusieurs cycles [31]. Ainsi, depuis la fin des années 80 et la première hybridation somatique intergénérique entre *Poncirus trifoliata* et *Citrus sinensis* [32], la fusion de protoplastes est devenue une composante majeure de différents programmes d'amélioration.

Cet article présente les principaux domaines d'applications de l'hybridation somatique pour l'utilisation des ressources génétiques des agrumes sur la base des travaux entrepris par le CIRAD et l'INRA. Cette présentation des programmes des équipes françaises s'accompagne d'un bilan des résultats obtenus au niveau international et est précédée par quelques éléments sur la structuration de la diversité des agrumes et des genres apparentés.

P. Ollitrault, Y. Froelicher, F. Carreel, S. Bruyère, S. Lotfy, F. Vanel, F. Maddi : CIRAD, station de Neufchâteau, Sainte-Marie, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe, FWI.

D. Dambier, A. d'Hont, C. Cabasson, K. Treanton : CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 1, France.

F. Luro : INRA, station de San-Giuliano, 20230 San-Nicolao, Corse, France.

S. Lotfy : INRA, Station d'El-Menzeh, BP 293 Kénitra, Maroc.

A. Joumaa : IRAL, BP 13-6185, Chourane, Beyrouth, Liban.

M. Grisoni : CIRAD, BP 180, 97455 Saint-Pierre cedex, Réunion, France.

Tirés à part : P. Ollitrault

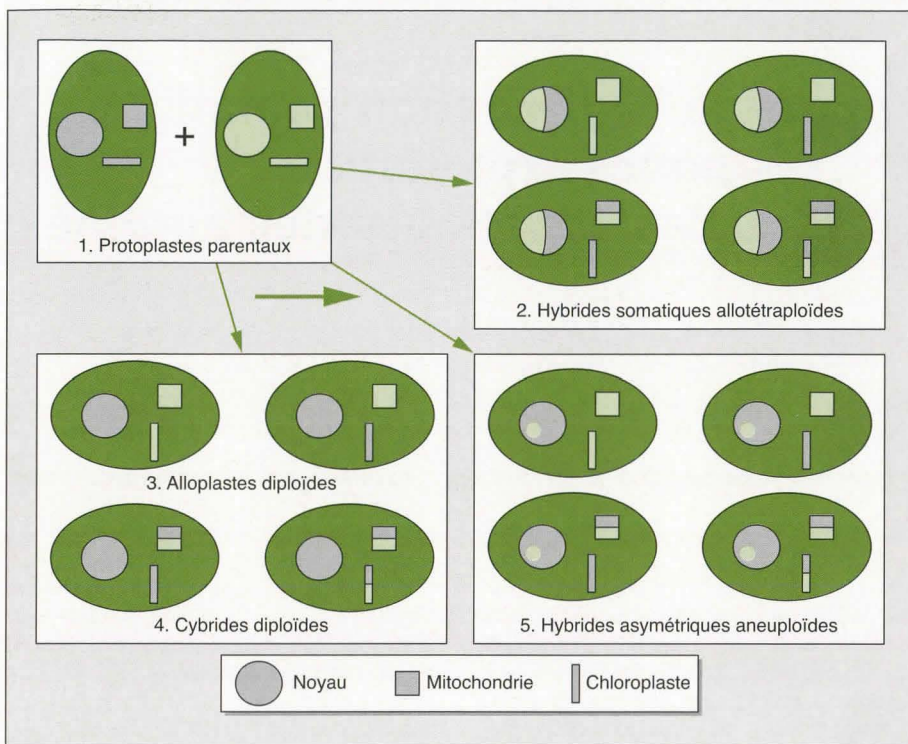


Figure 1. Différentes associations nucléo-cytoplasmiques générées par hybridation somatique.

Figure 1. Different nucleo-cytoplasmic associations arising from somatic hybridisation.

Organisation de la diversité et ressources génétiques utiles pour l'amélioration conventionnelle

Ressources génétiques des agrumes

Les agrumes regroupent trois genres sexuellement compatibles : le genre *Citrus* renferme la majorité des espèces consommées, le genre *Fortunella* comprend quelques cultivars (les kumquats) et le genre *Poncirus* monospécifique (*P. trifoliata*) est très important dans le domaine des porte-greffes du fait de ses nombreuses résistances aux contraintes biotiques. Les agrumes constituent le pool génique primaire des formes cultivées, au sens défini par Harlan [33]. La variabilité agronomorphologique des agrumes est

considérable. Elle concerne aussi bien les caractères pomologiques et organoleptiques que les résistances aux contraintes biotiques et abiotiques et ouvre de très larges perspectives pour la création variétale. De nombreuses tolérances aux facteurs biotiques ont ainsi été identifiées : tolérance aux sols calcaires de *C. jambhiri*, *C. macrophylla*, *C. volkameriana* et de *C. amblycarpa* ; tolérance à la salinité du limettier Rangpur et du mandarinier Cléopâtre ; tolérance au froid des mandariniers Satsuma, des kumquats et de *Poncirus trifoliata* ; tolérance à la sécheresse du limettier Rangpur. Des résistances aux principaux ravageurs et maladies sont également présentes : résistance aux *Phytophthoras* sp. de certains pamplemoussiers et mandariniers, des bigaradiers, de *C. volkameriana*, et de *C. amblycarpa* ; résistance à la cercosporiose africaine des agrumes (maladie fongique due à *Phaeomalaria angolensis*) chez les pamplemoussiers, les citronniers et les mandariniers Satsuma et Beauty ; immunité à la tristezza (maladie virale) de *Poncirus trifoliata* et résistance partielle du mandarinier Cléopâtre, de *C. amblycarpa*, du limettier

Rangpur, de *C. jambhiri* et *C. volkameriana* ; tolérance au chancre citrique (maladie bactérienne due à *Xanthomonas campestris* de *C. junos* et de certains mandariniers : Satsuma, Dancy...) ; résistance aux nématodes de *Poncirus trifoliata*... Aux niveaux pomologique et organoleptique la diversité est également vaste (figure 2). Le diamètre des fruits varie de quelques centimètres pour les mandariniers, *Poncirus* et kumquat à plus de 30 cm pour certains pamplemoussiers ; l'albédo inexistant chez les kumquats et très peu développé chez les mandariniers constitue l'essentiel du fruit chez le cédratier ; la pulpe des fruits est verte, orange, jaune ou rouge et son acidité peut varier de nulle chez certains orangers tropicaux à très élevée chez les citronniers et les limes ; les arômes et huiles essentielles sont très diversifiés tant qualitativement que quantitativement. La période de production, enfin, s'étale, en zone méditerranéenne, de septembre pour les mandariniers Satsuma à juillet/août pour les orangers cv « Valencia late ». En regard de la très grande diversité du pool primaire et de la complète compatibilité sexuelle théorique entre les différents genres constituant les agrumes, les ressources génétiques effectivement exploitées par voie sexuée apparaissent très restreintes et très peu de cultivars commerciaux sont issus des programmes d'amélioration conventionnelle. Les principaux facteurs limitants pouvant expliquer cet état de fait sont :

- la polyembryonnie (forme d'apomixie partielle résultant de la prolifération d'embryons à partir des tissus nucellaires de l'ovule), qui a considérablement limité les brassages génétiques au sein des agrumes, tant durant la domestication [34] que depuis la mise en place de programmes de création variétale pour lesquels chaque combinaison parentale inclut généralement un géniteur femelle mono-embryonné. Seuls les cédratiers, les pamplemoussiers et quelques mandariniers produisent des graines mono-embryonnées d'origine zygotique ;
- les stérilités mâles et femelles, sélectionnées par l'homme pour la production de fruits sans pépins, ont également exclu de nombreux cultivars élités du pool génique exploitable par voie sexuée ;
- l'évolution des agrumes cultivés et la structuration de la diversité génétique. Les trois espèces principales sur le plan économique (oranger, pomelo, citronnier) dérivent en effet chacune de « prototypes » fortement hétérozygotes issus

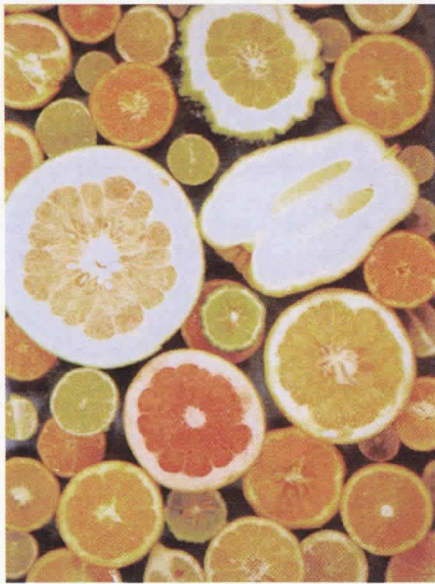


Figure 2. Diversité des fruits au sein du genre *Citrus*.

Figure 2. Fruit diversity in *Citrus*.

d'hybridations interspécifiques ; leur diversification intraspécifique est due à des mutations ponctuelles soumises à la sélection humaine en l'absence de recombinaison sexuée [35]. Toute tentative d'amélioration par recombinaison remet ainsi en cause les équilibres polygéniques déterminants de l'espèce. La structuration des mandarinières et pamplemoussiers est totalement différente et une amélioration par hybridation sexuée est envisageable au sein de chacune de ces espèces [35] ;

- l'hétérozygotie élevée de l'essentiel du germoplasme qui se traduit par de faibles probabilités d'associer de nombreux gènes favorables chez un même hybride ;
- la longueur de la phase juvénile et la lourdeur des évaluations qui demandent un pas de temps minimum de dix ans entre deux cycles de recombinaison.

Ressources génétiques des pools géniques secondaires et tertiaires

Les agrumes sont sexuellement compatibles avec certains genres plus éloignés (*Eremocitrus*, *Microcitrus*) qui renferment d'intéressants caractères de résistances comme la résistance à la sécheresse et à la salinité pour *Eremocitrus*. Les agrumes et ces deux genres originaires d'Australie constituent ainsi un complexe d'espèces

rel que l'a défini Pernes [36]. Toutefois, les hybrides intergénériques sont généralement fortement stériles [37]. Ceci interdit une utilisation efficace, par voie sexuée, de ce germoplasme car les hybrides de première génération présentent trop de caractères défavorables du parent sauvage.

Les autres genres de la famille des *Aurantiaceae* (tribu des *Citreae* et tribu des *Clausenae*) renferment par ailleurs de nombreux caractères de résistance dont certains sont absents des pools géniques primaires et secondaires telle la très forte résistance au sel et au bore de *Severinia buxifolia* ou l'immunité au huanglongbin (bactériose du phloème qui cause des dégâts considérables en Asie) de *Murraya paniculata*. Cette diversité est toutefois inexploitable par les voies d'amélioration conventionnelles en raison de l'incompatibilité sexuelle entre ces genres et les agrumes. Avec certains genres de la sous-tribu des *Citrinae* comme *Citropsis*, les hybridations sexuées avec les agrumes ont produit des graines incapables de germer [38] tandis que les combinaisons avec des genres plus éloignés ne produisent pas de graines [37]. Dans le cas des genres de la tribu des *Clausenae* (*Murraya*, *Clausena* et *Glycosmis*), l'incompatibilité sexuelle se manifeste par un arrêt de croissance des

tubes polliniques dans la partie supérieure du style [37].

Création d'hybrides somatiques : les techniques

Fusion de protoplastes et régénération

La maîtrise d'un système de régénération performant est un préalable indispensable à tout programme d'hybridation somatique. Chez les agrumes, l'ensemble des travaux s'appuie sur le potentiel embryogénique très élevé des cals friables issus des tissus nucellaires de l'ovule. Ainsi, toutes les combinaisons de fusion utilisent des protoplastes issus de ce type de cal pour au moins l'un des parents. La première phase de notre programme d'hybridation somatique a ainsi été l'établissement d'une collection de cals embryogènes et l'optimisation de la gestion de ces cals (figure 3) [39]. Une trentaine de cultivars d'agrumes sont aujourd'hui disponibles sous cette forme

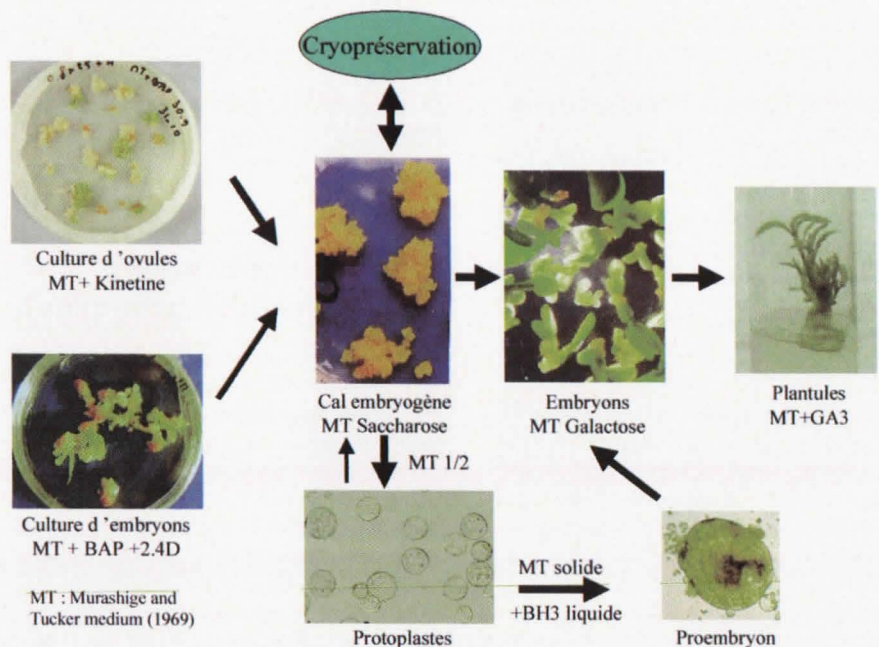


Figure 3. Induction et gestion des cals embryogènes d'agrumes (d'après Ollitrault *et al.* [39]).

Figure 3. Induction and management of *Citrus* embryogenic calli.

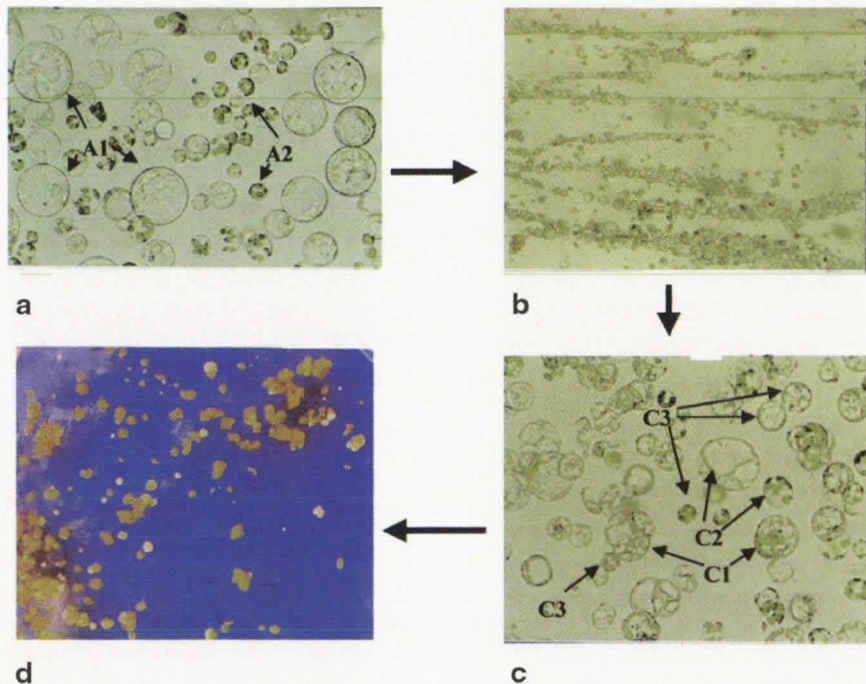


Figure 4. Électrofusion de protoplastes et régénération d'embryons.

a : Mélange de protoplastes de callos de mandarinier « Commun » (A1) et de protoplastes de feuille de kumquat « Marumi » (A2). b : Alignement des protoplastes dans le champ électrique. c : Population de protoplastes après émission de pulses électriques (C1 : hétérofusions ; C2 : homofusions ; C3 : protoplastes parentaux). d : Régénération d'embryons à partir de protoplastes électrofusionnés.

Figure 4. Protoplast electrofusion and embryo regeneration.

a : Mixed population of callus protoplasts from mandarin "Willow leaf" (A1) and leaf protoplasts of kumquat "Marumi" (A2). b : Protoplast alignment under electric field. c : Population of protoplast after electrofusion (C1 : heterofusion, C2 : homofusion, C3 : parental protoplasts). d : Embryo regeneration from electrofused protoplasts.

directement exploitable *via* l'hybridation somatique.

Historiquement, les premiers hybrides somatiques végétaux ont été obtenus après traitement chimique au polyéthylène glycol (PEG) sur des suspensions de protoplastes parentaux [40] et cette technique reste la plus couramment utilisée. Les protoplastes agglutinés en présence de PEG fusionnent lorsque la suspension est diluée par une solution basique très concentrée en ions Ca^{2+} . Une autre méthode permettant d'obtenir des hybrides par électrofusion de protoplastes a été développée au début des années 80 [41]. Pour cette technique, les protoplastes placés dans un milieu de faible conductivité sont soumis à un champ électrique qui induit leur polarisation et leur alignement. Des pulses de courant continu de forte intensité (> 200 V) sont ensuite appliqués à ces files de protoplastes afin de désorganiser temporairement les membranes et per-

mettre ainsi l'échange de matériel génétique [42]. C'est cette méthode que nous avons développée sur les agrumes (*figure 4*) [43].

Sélection des hybrides et caractérisation génomique

Les suspensions résultant de la fusion de protoplastes renferment une gamme de génotypes diversifiés tant pour leurs génomes nucléaires que cytoplasmiques. On y trouve en effet des protoplastes parentaux, des autofusions, des hétérofusions et des multifusions. La proportion des hétérofusions dépassant rarement 10 %, certains auteurs soumettent les suspensions de protoplastes à des pressions de sélection en faveur de ces structures hybrides (exigences nutritionnelles, salinité, résistance à des toxines voire à des antibiotiques). De telles pratiques de sélection limitent toutefois considérable-

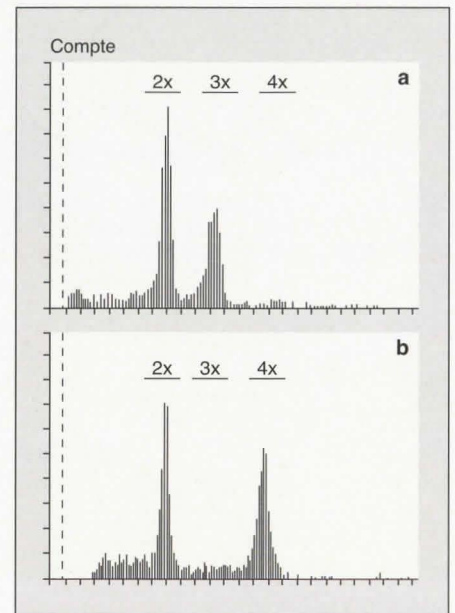


Figure 5. Analyse par cytométrie en flux (le citronnier « Lisbonne » est utilisé comme témoin interne diploïde) du niveau de ploïdie d'hybrides régénérés à partir de fusions de protoplastes haploïdes de clémentinier et diploïdes de mandarinier « Kinnow ». a : hybride somatique triploïde. b : hybride somatique tétraploïde.

Figure 5. Ploidy analysis by flow cytometry ("Lisbonne" lemon is used as diploid internal control) of hybrids arising from haploid clementine + diploid "Kinnow" mandarin protoplast fusion. a : triploid somatic hybrid. b : tetraploid somatic hybrid.

ment la gamme des ressources génétiques exploitables puisqu'elles requièrent la combinaison de génotypes possédant des comportements différents vis-à-vis de ces critères de sélection *in vitro*. Par ailleurs, la dégradation des protoplastes contre-sélectionnés peut nuire au bon déroulement des processus de régénération. Ainsi, la quasi-totalité des travaux réalisés sur les agrumes s'appuie sur une identification des hybrides somatiques parmi les plantules régénérées en l'absence de toutes pressions de sélection *in vitro*. Cette identification peut parfois être réalisée sur la base de marqueurs morphologiques, mais la pratique la plus courante est d'associer une évaluation du niveau de ploïdie (comptage chromosomique, cytométrie en flux, *figure 5*) et un contrôle de la nature hybride (isozymes, *figure 6* ; microsatellites et marqueurs cytoplasmiques).

Afin d'analyser précocement la composition cytoplasmique des plantules régénérées, nous avons développé des marqueurs



Figure 6. Analyse par électrophorèse enzymatique (phosphoglucomutase) de l'origine nucléaire de plants régénérés après fusions de protoplastes de pomelo « Star Ruby » et de limettier « Mexicain ». P : pomelo « Star Ruby » ; L : limettier « Mexicain » ; SP : plantes régénérées après fusion de protoplastes.

Figure 6. Analysis of nuclear origins of plants regenerated after "Star Ruby" grapefruit + "Mexican" lime somatic hybridization. P : "Star Ruby" grapefruit ; L : "Mexican" lime ; SP : plants regenerated after protoplast fusion.

CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*) associant l'amplification à partir d'amorces spécifiques universelles [44] et des restrictions enzymatiques. Cette technique est très performante au niveau chloroplastique, pour lequel la quasi-totalité de nos géniteurs sont différenciés (figure 7). En revanche, la diversité mitochondriale révélée par cet outil est beaucoup moins importante, ce qui limite son application aux combinaisons intergénériques. Au niveau intraspécifique, les analyses mitochondriales sont donc réalisées à l'aide de marqueurs RFLP en utilisant des sondes hétérologues.

Ces caractérisations routinières peuvent être complétées par des analyses approfondies lorsque se manifestent des phénomènes d'instabilité génomique. Ainsi l'hybridation génomique *in situ* (GISH) apparaît très prometteuse pour analyser la structure des génomes nucléaires complexes. Elle a, par exemple, permis de montrer que les hybrides hexaploïdes issus d'hybridations somatiques entre *Lycopersicon esculentum* (2x) et *Solanum lycopersicoides* (2x) possédaient deux fois le génome de *Lycopersicon esculentum* et qu'il existait des réarrangements entre les chromosomes des deux genres [45]. Des éliminations spécifiques de chromosomes d'*Allium cepa* chez des hybrides somatiques entre *Allium cepa* et *Allium ampeloprasum* ont par ailleurs pu être mises en évidence [46]. Toutefois, pour les agrumes, nos travaux montrent que cette technique ne permet pas de colorer la totalité des chromosomes (figure 8) ; elle ne sera donc pas utilisable pour analyser précisément la composition génomique

d'éventuels aneuploïdes. Elle devrait en revanche être applicable pour étudier la contribution de chaque parent à la formation d'hybrides intergénériques multiploïdes.

Élargir le pool génétique effectivement exploitable au sein du complexe d'espèces et l'étendre au pool génique tertiaire (figure 9)

Comme nous l'avons vu précédemment, certaines spécificités du système de reproduction des agrumes (apomixie, nombreuses stérilités) limitent l'utilisation, par voie sexuée, de la diversité du complexe d'espèces. Les barrières reproductives totales entre les différentes sous-tribus interdisent par ailleurs l'accès à un réservoir de gènes de résistance particulièrement intéressant. Dans un tel contexte, l'hybridation somatique qui permet de s'affranchir des contraintes de la sexualité paraît particulièrement adaptée pour une meilleure exploitation des ressources génétiques potentielles des agrumes.



Figure 7. Analyse par CAPS (amorce : trnT3/trnD2 (44) et enzyme de restriction *DraI*) de la ségrégation des chloroplastes parentaux chez des hybrides somatiques entre le pomelo « Star Ruby » et le mandarinier « Commun ». 1 : marqueur de taille, 2 à 11 : hybrides somatiques, 12 : mandarinier « Commun », 13 : pomelo « Star Ruby ».

Figure 7. CAPS analysis (trnT3/trnD2 primers (44) and *DraI* restriction enzyme) of chloroplast segregation in a population of somatic hybrids between "Star Ruby" grapefruit and "Willow Leaf" mandarin. 1 : size marker, 2 to 11 : somatic hybrids, 12 : "Willow Leaf" mandarin, 13 : "Star Ruby" grapefruit.

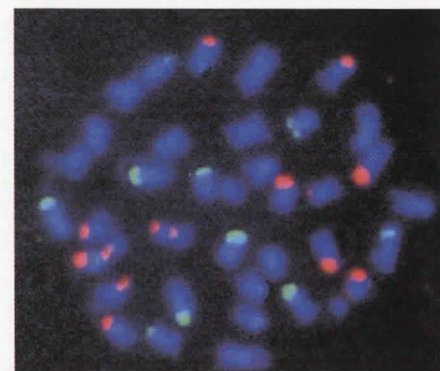


Figure 8. GISH (*genomic in situ hybridizations*) sur un étalement chromosomique de l'hybride somatique intergénérique (*Poncirus trifoliata* + *Citrus reticulata* cv «Mandarin Commun»). L'ADN génomique de *P. trifoliata* est marqué en rouge, celui de *C. reticulata* en vert ; un marquage au dapi permet de visualiser l'ensemble des chromosomes.

Figure 8. GISH (*genomic in situ hybridization*) on chromosomes of *Poncirus trifoliata* + *Citrus reticulata* cv "Willow leaf" somatic hybrid. Staining of genomic DNA are respectively red and green for *P. trifoliata* and *C. reticulata*. Dapi staining reveals all chromosomes.

Autoriser les brassages génétiques entre les génotypes polyembryonnés ou stériles du pool primaire

L'hybridation somatique permet de contourner la nature apomictique des

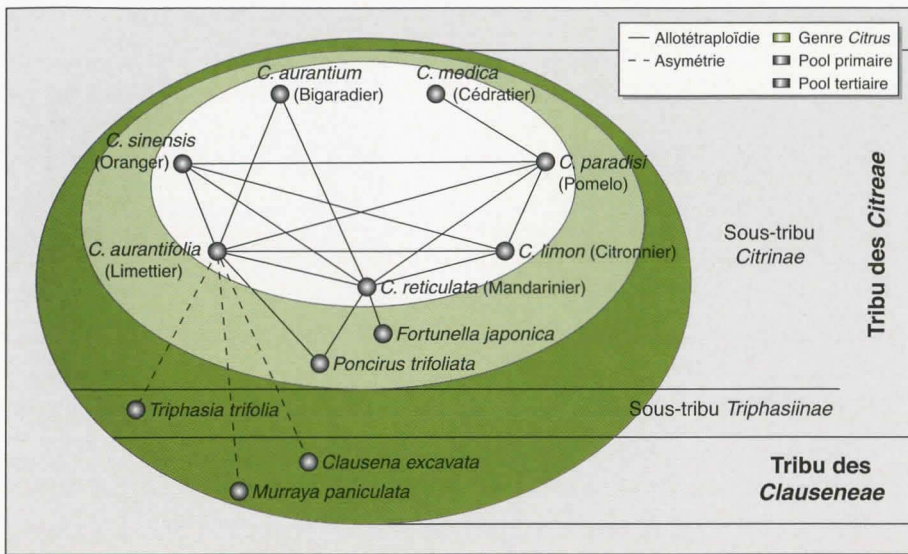


Figure 9. Combinaisons interspécifiques réalisées au Cirad ayant conduit à l'obtention d'hybrides somatiques allotétraploïdes ou asymétriques.

Figure 9. Interspecific combinations obtained at Cirad producing allotetraploid or asymmetric somatic hybrids.

générateurs afin de recombiner les caractères de deux parents poly-embryonnés. Les hybrides tétraploïdes issus d'hybridations somatiques entre cultivars poly-embryonnés produisent en effet des gamètes diploïdes associant des gènes de chaque parent. De tels gamètes mâles utilisés pour féconder des cultivars diploïdes mono-embryonnés permettront ainsi de générer des hybrides triploïdes possédant des caractéristiques favorables de deux parents apomictiques (voir plus bas).

Les cultivars poly-embryonnés étant particulièrement favorables à l'induction de calcs embryogènes, l'hybridation somatique s'avère aisée. Cette approche peut facilement être étendue à des cultivars présentant des stérilités femelles dues à une dégénérescence tardive des ovules comme le pomelo Star Ruby, les mandarinières Satsuma et les orangers Valencia Late ou Washington Navel, pour lesquels des calcs embryogènes ont été obtenus par culture d'ovules immatures.

Des hybrides tétraploïdes ont ainsi été créés par le Cirad pour une vingtaine de combinaisons entre cultivars apomictiques dont douze font partie d'un plan de croisement dialléle entre six espèces du genre *Citrus* (mandarinier, oranger, bigaradier, pomelo, citronnier et limettier ; voir plus bas, *tableau 1*). Ces hybrides viennent s'ajouter à ceux obtenus par différentes équipes [32, 47-49]

et on peut estimer à une centaine le nombre de tels génotypes tétraploïdes créés entre générateurs poly-embryonnés durant la dernière décennie. La mise à fleur et à fruit d'hybrides tétraploïdes générés lors des premiers travaux dans ce domaine a par ailleurs permis de démontrer la fertilité de combinaisons impliquant un, voire deux parents stériles [50].

Exploiter la diversité des genres sexuellement incompatibles

Sur un plan général, l'une des premières motivations du développement de l'hybridation somatique était de contourner les problèmes d'incompatibilité dus aux interactions entre pollen et pistil ainsi que ceux découlant d'interaction plante mère/embryons hybride. Cette technique paraît ainsi particulièrement adaptée à l'exploitation large des pools génétiques sexuellement incompatibles. Afin d'en évaluer les limites pratiques, dans la sous-famille des *Aurantioideae*, nous avons réalisé une série d'hybridations, associant des *Citrus* à divers genres, et présentant une gamme de divergence taxonomique de l'intragénérique à l'intertribale. Des régénérations de structures hybrides ont été obtenues quel que soit le niveau de divergence

taxonomique (*tableau 2*). En revanche, la régénération de plantules ou de méristèmes caulinaires à partir des calcs ou des structures embryonnaires hybrides n'a été possible que pour les combinaisons réalisées au sein des agrumes. L'analyse du génome nucléaire des trois combinaisons les plus éloignées (entre sous-tribus et entre tribus) témoigne par ailleurs de l'instabilité chromosomique des génomes hybrides [51]. Ceux-ci possèdent en effet des niveaux de ploïdie plus élevés que ceux attendus et certains marqueurs parentaux (isozymes et microsatellites) sont absents chez les hybrides.

Sur le international, les hybridations somatiques réalisées au sein de la sous-tribu des *Citrinae* ont permis de régénérer des plantes viables pour une quinzaine de combinaisons entre générateurs sexuellement incompatibles [4, 52]. Toutefois, ces plantes présentent souvent des caractères rédhitoires comme des sensibilités élevées à certaines maladies fongiques ou une très faible vigueur. Les résultats concernant trois combinaisons inter-sous-tribus [4, 53] et trois combinaisons intertribales [53-55] ont été publiés et les auteurs font état de très grandes difficultés pour obtenir des plantules ou des pousses viables. Les structures génomiques déséquilibrées ainsi que des incompatibilités au niveau des processus morpho-génétiques parentaux pourraient expliquer les difficultés à régénérer des plantes viables pour les combinaisons éloignées.

L'instabilité des génomes nucléaires chez les hybrides issus de combinaisons entre générateurs génétiquement éloignés a été observée au sein de nombreux complexes d'espèces [7, 9, 30]. Ainsi, par exemple, il existe chez les *Brassica* une corrélation positive entre la divergence génétique des espèces parentales et la fréquence des éliminations chromosomiques [56]. Les résultats publiés chez les agrumes témoignent d'une grande stabilité et d'une addition équilibrée des génomes parentaux pour la majorité des combinaisons intra-sous-tribu [4]. Les rares cas de ploïdies inattendues concernent une hybridation entre *Severinia buxifolia* (2x) et *C. sinensis* (2x) qui a produit des plantes triploïdes [57] et une combinaison entre une espèce tétraploïde (*Fortunella hindii*) et une espèce diploïde *P. trifoliata* qui a généré des hybrides pentaploïdes [58]. Dans les cas d'hybridations intertribales, seules deux publications font état du niveau de ploïdie des plantes régénérées. Celui-ci est conforme

Tableau 1

Liste des hybrides somatiques tétraploïdes et des alloplastés obtenus au CIRAD par hybridation somatique entre agrumes apomictiques diploïdes

Généiteurs		Hybrides somatiques	Alloplastés Noyau/Cytoplasme
Mandarinier commun	Md King of Siam	+	
	Md Beauty	+	
	Oranger Shamouti	++	
	Oranger Valencia		Or/Md
	Pomelo Star Ruby	++	Md/Po
	Pomelo Duncan		Po/Md
	Bigaradier	++	
	Citronnier Eureka	++	Ci/Md
	Citronnier LAC	++	Ci/Md
	Limettier Mexicain	++	
<i>Fortunella japonica</i>	++	FJ/Md	
<i>Poncirus trifoliata</i>	++		
Mandarinier Sunki	Citrange Carrizo	++	
Oranger Shamouti	Md Beauty	++	
	Pomelo Star Ruby	++	
	Limettier Mexicain	++	
	Citronnier LAC	++	
Oranger Valencia Late	Md Sanguine	+	
Pomelo Star Ruby	Cédrat de Corse	++	
	Citronnier LAC	++	
	Limettier Mexicain	++	
Limettier Mexicain	Bigaradier	++	
	Citronnier LAC	+	
	Citrange Carrizo	++	
Citronnier LAC	Citronnier Eureka	++	

+ matériel *in vitro* ; ++ plants greffés ; Or : oranger ; Md : mandarinier ; Po : pomelo ; Ci : citronnier ; FJ : *Fortunella japonica*.

List of somatic hybrids and alloplasts obtained by Cirad from somatic hybridisation between diploid apomictic

Tableau 2

Capacité de régénération et stabilité des génomes nucléaires des hybrides somatiques en fonction de la divergence génétique entre les parents

Généiteurs		RSH	PPH	Ploïdie	EMP
Intragénérique	<i>Citrus reticulata</i> (2x) / <i>Citrus paradisi</i> (2x)	+	+	4x	-
	<i>Citrus aurantifolia</i> (2x) / <i>Citrus paradisi</i> (2x)	+	+	4x	-
	<i>Citrus reticulata</i> (2x) / <i>Citrus aurantifolia</i> (2x)	+	+	4x	-
Intergénérique	<i>Citrus reticulata</i> (2x) / <i>Citrus sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> (2x)	+	+	4x	-
	<i>Citrus reticulata</i> (2x) / <i>Poncirus trifoliata</i> (2x)	+	+	4x	-
	<i>Citrus reticulata</i> (2x) / <i>Fortunella japonica</i> (2x)	+	+	4x	-
Inter-sous-tribus	<i>Citrus aurantifolia</i> (2x) / <i>Triphasia trifoliata</i> (2x)	+	-	6x	+
Intertribale	<i>Citrus aurantifolia</i> (2x) / <i>Murraya paniculata</i> (2x)	+	-	?	+
	<i>Citrus aurantifolia</i> (2x) / <i>Clausena excavata</i> (6x)	+	-	10x à 12x	+

RSH : Régénération de structures hybrides.
 PPH : Plantes ou pousses hybrides.
 EMP : Élimination de certains marqueurs nucléaires parentaux.

Regeneration potential and nuclear genomic stability of somatic hybrids related with taxonomic divergence between parents

à celui attendu pour une combinaison entre les genres *Citrus* et *Murraya* [54] tandis que les plantes régénérées pour une combinaison entre *Citrus sinensis* (2x) et *Clausena lansium* (2x) sont hexaploïdes [55].

Les défauts de nombreux hybrides entre genres sexuellement incompatibles, la difficulté à régénérer des plantes pour les combinaisons intertribales et certaines combinaisons entre sous-tribus, ainsi que les apparentes instabilités génomiques pour les combinaisons les plus éloignées montrent clairement les limites de l'hybridation somatique symétrique pour exploiter la diversité au sein de la sous-famille des *Aurantioideae*. La mise en place de programmes d'hybridation asymétrique permettant de n'introgresser que des portions limitées des génomes des espèces sauvages apparaît ainsi particulièrement souhaitable.

L'efficacité de l'hybridation somatique symétrique pour combiner des génotypes poly-embryonnés ou stériles de la sous-tribu des *Citrinae* ouvre, en revanche, des perspectives très larges pour l'amélioration des porte-greffes et la création de cultivars triploïdes.

Additionner les caractères dominants en évitant la recombinaison sexuée ; création de porte-greffes cumulant des tolérances aux facteurs biotiques et abiotiques

Les porte-greffes doivent assurer l'adaptation des agrumes aux différents contextes pédoclimatiques de l'aire de culture et apporter des résistances à de nombreux agents pathogènes (*Phytophthora* sp., Tristeza, nématodes, mal secco...). Leurs interactions avec les cultivars déterminent également la qualité des fruits qui constitue un facteur de sélection important, particulièrement pour les productions destinées au marché du fruit frais. Compte tenu du contrôle polygénique de la

plupart de ces caractères, c'est ainsi plusieurs dizaines de gènes qu'il convient de gérer dans le cadre de la recombinaison sexuée. L'hétérozygotie de la plupart des agrumes étant élevée, la probabilité de sélectionner un génotype associant l'ensemble des gènes favorables est très faible. Ceci est particulièrement vrai pour les porte-greffes, pour lesquels la lourdeur des procédures d'évaluation interdit le criblage de populations hybrides très importantes. L'hybridation somatique est ainsi apparue comme une alternative séduisante permettant d'additionner l'ensemble des gènes de deux individus présentant des caractères complémentaires afin d'exploiter efficacement le germoplasme [59].

Le bassin méditerranéen est l'une des zones de productions présentant les plus fortes contraintes pour les porte-greffes. On y trouve en effet associées des contraintes abiotiques majeures (salinité, sols calcaires) et des pressions sanitaires élevées (*Phytophthora* sp., mal secco, nématodes) considérablement aggravées, ces dernières décennies, par la dispersion de la Tristeza sur la quasi-totalité du bassin méditerranéen. Aucun des porte-greffes traditionnels ne répondant à ce faisceau de contraintes, la création d'une nouvelle génération variétale constitue

une des priorités des programmes de recherche dans la région [60]. Le CIRAD a ainsi engagé un programme pour la création, par hybridation somatique, de porte-greffes répondant aux contraintes du bassin méditerranéen. Les différentes résistances et tolérances requises sont en effet présentes chez les agrumes (tableau 3) et certains couples de génotypes permettent d'associer l'ensemble des caractères requis. Ainsi le *Poncirus trifoliata* et certains de ses hybrides avec les *Citrus* (citrange Carriizo : *C. sinensis* × *P. trifoliata* ; citrumello 4475 *C. paradisi* × *C. trifoliata*) apportent des résistances aux principaux facteurs biotiques tandis que de nombreuses tolérances aux stress abiotiques peuvent être trouvées chez les *Citrus*. Notre stratégie s'applique donc principalement à additionner les génomes du *Poncirus* ou de ses hybrides à ceux de certains *Citrus*. Plusieurs combinaisons intergénériques ont été réalisées et sont à différents stades de régénération. Un premier hybride intergénérique entre *Poncirus trifoliata* cv « Pomeroy » et *C. reticulata* cv « Commun » s'avère très prometteur (figure 10). Cet hybride allotétraploïde, qui a hérité du *Poncirus trifoliata* l'immunité à la Tristeza, présente également un comportement excellent sur sol

Tableau 3

Dispersion des caractères de résistance aux facteurs biotiques et abiotiques chez quelques agrumes et genres apparentés

	Contraintes abiotiques				Contraintes biotiques		
	Alc	Chl	Bor	Sec	Tri	Nem	Phy
Mandarinier Cléopâtre	pR	RR	pR	RR	R	S	pR
Bigaradier	R	pR	R	R	S	S	R
Oranger	pR	S	pR	R	R	S	S
<i>C. amblycarpa</i>	R	R	?	S	R	S	R
<i>C. taiwanica</i>	R	R	pR	RR	S	S	R
Agrumes acides							
Limettier Rangpur	pR	RR	R	RR	R	S	S
Rough lemon	RR	pR	pR	R	R	S	S
<i>C. macrophylla</i>	R	R	RR	R	S	S	R
<i>C. volkameriana</i>	R	pR	?	R	R	S	R
Limettier Mexicain	R	pR	pR	R	S	S	S
<i>Citrinae</i>							
<i>Poncirus trifoliata</i>	S	S	S	pR	RR	RR	RR
<i>Eremocitrus glauca</i>	R	RR	RR	RR	R	S	R
<i>Severinia buxifolia</i>	pR	RR	RR	R31			

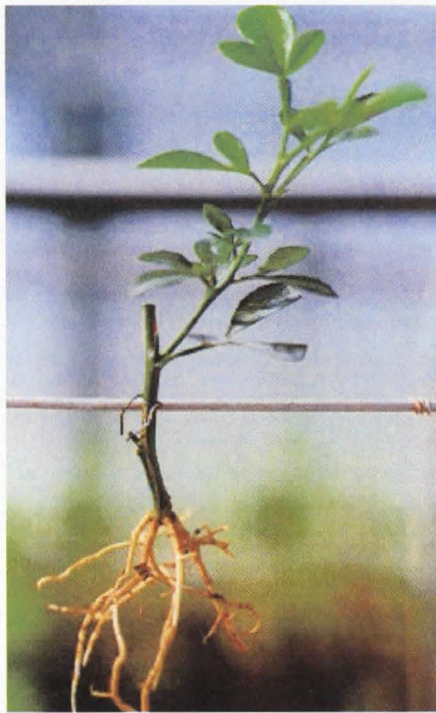


Figure 10. Bouturage herbacé de l'hybride somatique intergénérique Flhorig1 (*P. trifoliata* + *C. reticulata* cv « Mandarinier Commun ») en vue de son évaluation multilocale.

Figure 10. Softwood cutting of the Flhorig1 intergeneric somatic hybrid (*P. trifoliata* + *C. reticulata* cv "Willow leaf") for further multilocation assessment.

calcaire à l'image de *C. reticulata* cv « commun ». Des résultats préliminaires suggèrent, par ailleurs, une très bonne résistance vis-à-vis des *Phytophthora* sp. comme pour le *Poncirus trifoliata*. Cet hybride entre aujourd'hui en évaluation agronomique multilocale en partenariat avec le Maroc, la Turquie, le Liban et Cuba.

La dominance de nombreux caractères de résistance ou de tolérance est confirmée par les travaux des équipes de Floride qui disposent d'ores et déjà de nombreuses références sur le comportement agronomiques de plus de trente nouveaux porte-greffes allotétraploïdes [61]. Par ailleurs, les hybrides réalisés avec au moins l'un des parents produisant des graines poly-embryonnées présentent ce même caractère et peuvent donc aisément faire l'objet de multiplication conforme par semis [61].

Manipuler la ploïdie du complexe d'espèce pour créer des cultivars triploïdes

La quasi-totalité des génotypes d'agrumes est diploïde avec quelques exceptions comme la lime à gros fruits (*Citrus latifolia*, triploïdes) et *Fortunella indsii* (tétraploïde). Des mécanismes de polyploïdisation spontanés tels la formation de gamètes diploïdes ou le doublement chromosomique des tissus nucléaires ont été décrits au début des années 70 [62]. Ils ont été exploités pour manipuler la ploïdie du complexe d'espèce en vue de créer des cultivars triploïdes aspermes [63]. L'absence de pépin dans les fruits est en effet un critère essentiel pour le marché du fruit frais. La recherche de stérilités femelles constitue ainsi un objectif majeur de sélection, de même que les stérilités mâles afin d'éviter toute pollinisation croisée sur des cultivars auto-incompatibles comme les clémentiniers.

Les programmes d'amélioration s'appuyant sur la formation de gamètes diploïdes spontanés ont été limités par la faible fréquence de ces événements, tandis que les travaux d'hybridation entre diploïdes et tétraploïdes se sont heurtés à la très faible diversité du gémoplasme tétraploïde et à la dépression de consanguinité liée à l'autotétraploïdie [34]. Très peu de cultivars commerciaux sont ainsi issus de ces différents travaux.

Dans les années 90, l'hybridation somatique a relancé l'intérêt pour les manipulations de ploïdie chez les agrumes avec deux applications :

- la diversification du pool de géniteurs tétraploïdes [47, 64] ;
- la synthèse directe d'hybrides triploïdes par fusion de protoplastes haploïdes et diploïdes [65].

Le Cirad développe les deux axes dans le cadre d'un programme de diversification variétale plus spécialement ciblé sur le groupe des mandariniers qui prend une place croissante sur le marché du fruit frais européen. Des génotypes présentant des caractères de résistances à certaines contraintes biotiques comme la cercosporiose africaine, le chancre citrique et la « chlorose variéguée » sont par ailleurs insérés dans ce programme d'hybridation somatique afin d'intégrer

les gènes de résistance dans les compartiments tétraploïdes et triploïdes.

Diversification du compartiment tétraploïde du complexe d'espèce

Pour la quasi-totalité, les plantes régénérées après fusion entre agrumes diploïdes (*Citrus* et *Fortunella*) sont soit des hybrides allotétraploïdes, soit des diploïdes possédant l'un des génomes nucléaires parentaux. Les autotétraploïdes sont très rares et les plantes de niveau de ploïdie supérieur à 4x inexistantes. Si la plupart des combinaisons produisent une majorité d'hybrides, d'autres en revanche conduisent principalement à la régénération de diploïdes possédant l'un des génomes nucléaires parentaux ; c'est en particulier le cas des combinaisons entre le mandarinier commun et différents oranges. L'analyse des allotétraploïdes à l'aide de marqueurs moléculaires et de la cytométrie en flux a permis de montrer qu'ils résultaient bien d'une addition complète des génomes diploïdes parentaux. De tels hybrides somatiques ont pu être sélectionnés pour une vingtaine de combinaisons (tableau 1) présentant de l'intérêt pour l'amélioration des cultivars et sont en cours de multiplication. Ils serviront de pollinisateurs sur des cultivars mono-embryonnés. La faisabilité de la synthèse de triploïdes par cette voie a d'ores et déjà été démontrée dans le cadre de programmes d'amélioration du citronnier [66] et du pamplemoussier [67]. Cette stratégie est celle qui produit les descendances triploïdes les plus polymorphes et hétérozygotes relativement à celles que nous développons en parallèle (exploitation des 2n gamètes, fusion diploïde + haploïde) [64].

Synthèse directe de triploïdes par hybridation somatique entre génotypes diploïde et haploïde

Les fusions entre des protoplastes haploïdes de clémentinier obtenus par gynogenèse induite [68] et des protoplastes d'une dizaine de cultivars diploïdes ont produit des populations de plantes hybrides triploïdes, tétraploïdes et pentaploïdes (tableau 4). Cette hétérogénéité est sans doute liée à l'instabilité de la ploïdie constatée au niveau des

Tableau 4**Effectifs des hybrides polyploïdes obtenus au Cirad par fusions de protoplastes haploïdes de clémentinier et des protoplastes de cultivars diploïdes**

Géniteurs diploïdes	Hybride 3x	Hybride 4x	Hybride 5x
Md. Commun	19	2	0
Md. Murcott	1	3	1
Md. Kinnow	24	19	3
Md. Sunki	8	2	1
Md. Beauty	3	10	0
Oranger Shamouti	15	2	0
Oranger Valencia Late	14	18	0
Bigaradier	14	1	0
Limettier Mexicain	5	10	0
Pomelo Star Ruby	13	35	5
Kumquat Marumi	6	5	0
Total	122	107	10

Polyploid hybrids obtained by Cirad from haploid clementine protoplast and diploid cultivar protoplast

lignées de cals haploïdes (figure 11). L'analyse des dosages alléliques par électrophorèse enzymatique montre en effet que les hybrides triploïdes, tétraploïdes et pentaploïdes sont issus de l'addition respectivement d'un, de deux et de trois génomes haploïdes au génome du cultivar diploïde. Ces populations ouvrent ainsi la voie à l'analyse des effets des dosages alléliques sur l'expression des caractères.

Les triploïdes issus de ces combinaisons sont en cours de multiplication (figure 12) et entrent dans le réseau d'évaluation du Cirad et de l'INRA. Les hybrides tétraploïdes enrichissent

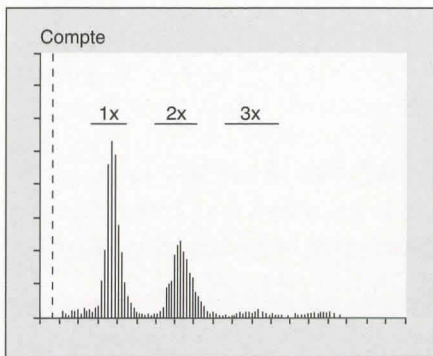


Figure 11. Variation du niveau de ploïdie parmi des protoplastes isolés à partir d'un cal « haploïde » de clémentinier analysés par cytométrie en flux.

Figure 11. Ploidy variation among protoplasts isolated from a "haploid" clementine embryogenic callus line analysed by flow cytometry.

pour leur part le compartiment tétraploïde du complexe d'espèces.



Figure 12. Multiplication par greffage d'un hybride somatique triploïde obtenu par fusion de protoplastes haploïdes de clémentinier et de protoplastes diploïdes de pomelo « Star Ruby ».

Figure 12. Grafted plant of a triploid hybrid obtained by haploid clementine + diploid "Star Ruby" grapefruit protoplast fusion.

Cette stratégie de synthèse d'hybrides triploïdes est la seule qui permette de conserver l'intégralité du génome du cultivar diploïde sans recombinaison. Elle devrait être particulièrement intéressante pour valoriser les cultivars diploïdes traditionnels, adaptés aux conditions et aux attentes qualitatives des marchés locaux, mais qui contiennent généralement de très nombreux pépins. Elle est actuellement limitée par le faible potentiel des haplométhodes chez les agrumes [68, 69] et donc par la très faible diversité du compartiment haploïde. Le développement de l'hybridation gaméto-somatique à partir de protoplastes de microspores [70] permettrait d'en accroître considérablement les perspectives.

Générer de nouvelles associations nucléo-cytoplasmiques

Aucun élément n'étant disponible, chez les agrumes, concernant l'influence des cytoplastes sur l'expression des caractères agronomiques ou pomologiques, très peu de programmes se sont appliqués à recombinaison *via* des hybridations somatiques asymétriques. Ainsi, les travaux réalisés à la fin des années 80 [20, 24] pour l'obtention, par cette voie, de cybrides ou d'aloplastes présentant des stérilités mâles, sont restés sans lendemain. La quasi-totalité des agrumes possédant de nouvelles associations nucléocytoplasmiques sont donc des sous-produits de programme d'hybridations somatiques classiques.

Des aloplastes sont ainsi issus de six combinaisons de notre programme de diversification du compartiment tétraploïde (tableau 1). La plupart ont été obtenus dans le cadre de combinaisons entre protoplastes de cal embryogène pour l'un des parents et protoplastes de feuille pour l'autre. C'est par exemple le cas pour des combinaisons entre des cals de mandarinier cv « Commun » et des feuilles d'oranger cv « Valencia » et de pomelo cv « Duncan » réalisées en partenariat avec les équipes floridiennes de l'IFAS [71]. Aucun hybride nucléaire n'avait été obtenu pour ces combinaisons ; en revanche, des plantes diploïdes possédant des génomes nucléaires d'oranger ou de pomelo avait été régéné-

Summary

Somatic hybridisation potential for *Citrus* germplasm utilization

P. Ollitrault, D. Dambier, Y. Froelicher, *et al.*

Somatic hybridization is a means of increasing genetic variability of gene pools involving several crops, not only by overcoming sexual incompatibility between species, but also by combining nuclear, chloroplastic and mitochondrial genomes in new patterns (Figure 1). It appears particularly well adapted for Citrus with regards to breeding system constraints (apomixis, sterility) and the genetic structure of gene pools. This paper presents major applications of somatic hybridization in Citrus on the basis of research carried out by the French Cirad and INRA research teams.

Organization of Citrus germplasm diversity. There is total sexual compatibility between all Citrus, Poncirus and Fortunella species, with high agronomic and pomologic diversity (Figure 2). Some sexual hybrids can also be obtained between these three genera and Microcitrus and Eremocitrus. Sexual breeding programmes have only tapped a very small proportion of this diversity, mainly because of: (i) the apomixis or sterility of many cultivars; (ii) the high level of heterozygosity of the germplasm (particularly for species like sweet orange, grapefruit or lemon that arise from interspecific hybridization); and (iii) the long juvenile phase. Other genera of Citreae and Clauseneae tribes present interesting resistance traits that cannot be recombined with Citrus due to sexual incompatibility.

Somatic hybridization techniques. Establishment of a nucellar embryonic callus library is a prerequisite for efficient citrus somatic hybridization programmes (Figure 3). For successful regeneration from citrus protoplast fusions, at least one parental protoplast population has to arise from the callus. Somatic hybridization is carried out by protoplast electrofusion (Figure 4) and the regenerated embryos or plantlets are characterized by flow cytometry (Figure 5), isozyme analysis (Figure 6), and CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) cytoplasmic markers (Figure 7) in order to assess the ploidy level and nuclear and cytoplasmic origins, respectively. Genomic in situ hybridization should be an interesting technique for the analysis of multiploid hybrids (Figure 8).

Tapping the wide genetic diversity (Figure 9). Citrus polyembryonic (apomictic) and sterile cultivars are currently widely used for the synthesis of fertile tetraploid hybrids. We have obtained hybrids for 20 combinations of this kind (Table 1) and more than 100 hybrid combinations have been obtained worldwide. Somatic hybrids between sexually incompatible species have been achieved, but their breeding potential seems limited due to unfavourable traits and problems of nuclear genome instability for inter-subtribe and inter-tribe combinations. The development of asymmetric hybridization seems essential for optimizing the use of this germplasm.

Adding parental genomes for rootstock breeding. The search for rootstocks resistant to Citrus tristeza virus and withstanding other constraints such as drought, alkalinity, salinity, Phytophthora and nematode problems is a critical priority for the citrus industry in the Mediterranean Basin. Progress in citrus rootstock genetic improvement is difficult through conventional sexual breeding programmes, mainly because of the heterozygosity of the progenitors, which induce high segregation of characters in the progeny, thus reducing the probability of obtaining recombinant hybrids cumulating all genes and traits of interest from the two parents. The creation of somatic hybrids is therefore highly promising as all dominant traits can be cumulated, irrespective of the heterozygosity level in the breeding material. Our programme focuses on combinations between Citrus for abiotic resistance and Poncirus for biotic resistance (Table 2). One Poncirus trifoliata x Citrus reticulata hybrid (Figure 10) is very promising as it cumulates calcareous soil tolerance (ok??) and tristeza disease resistance. International agronomic assessments are under way and the initial results are highly promising.

Ploidy manipulation for triploid cultivar breeding. Seedlessness is a major criterion for the Citrus fresh fruit market. Triploid breeding thus appears very promising for the selection of new citrus cultivars. Cirad developed two somatic hybridization strategies for triploid synthesis. The first one involves diversification of the tetraploid gene pool to be used for sexual crosses with diploid monoembryonic cultivars (Table 1). This strategy has enabled high diversification of this gene pool internationally. The second one involves direct synthesis of triploid hybrids by protoplast fusion between diploid and haploid lines. By this method, a haploid genome can be added to the whole diploid genome of high organoleptic quality cultivars without recombination. Triploid hybrids have been obtained for 11 parental combinations as well as some tetraploid and pentaploid plants (Table 3). This ploidy polymorphism can be due to the presence of diploid and triploid cells in the haploid callus, as detected by flow cytometry (Figure 11). Triploid hybrids (Figure 12) should be exploited directly after evaluation, while tetraploid hybrids will join the allotetraploid pool for further sexual breeding with diploids.

Creation of new nuclear-cytoplasmic combinations. The search for new nucleocytoplasmic associations has not been a priority of Citrus research programmes, but several allowplants have been obtained by symmetric somatic hybridization. Chloroplast segregation could occur between different regenerated plants of the same combination (Figure 7) and mitochondrial genomes are always inherited from the parent callus for leaf protoplast/callus protoplast combinations. These alloplants have paved the way for nucleocytoplasmic interaction studies, and the results should open new avenues for Citrus germplasm development.

In coming years, somatic hybridization programmes throughout the world will dramatically alter the Citrus gene pool, with a shift from a diploid to a polyploid complex. This will give rise to new strategies for Citrus germplasm management and conservation.

rées alors que les protoplastes isolés à partir de feuille ne possèdent pas d'aptitude à l'embryogenèse sur les milieux de culture utilisés. L'étude des RFLP cytoplasmiques à l'aide de deux sondes chloroplastiques et sept sondes mitochondriales a permis de montrer que ces plantes possédaient des noyaux d'orangers ou de pomelos dans un cytoplasme de mandarinier en l'absence de toute recombinaison des organites cytoplasmiques [71]. La transmission, chez les plantes régénérées (qu'elles soient tétraploïdes ou diploïdes), du génome mitochondrial du parent apporté sous forme de cal est également apparue systématique pour des fusions entre cals de mandarinier cv « Commun » avec des feuilles de Kumquat cv Marumi, de Citronnier cv « Eureka » et de *Poncirus trifoliata* cv « Pomeroy » [43].

Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par différents auteurs [72-75] qui montrent par ailleurs que, pour de nombreuses combinaisons il existe une ségrégation aléatoire des génomes chloroplastiques parentaux. L'ensemble de ces données suggère l'existence d'une composante mitochondriale de l'aptitude cellulaire à l'embryogenèse [72].

Dans le cadre des fusions entre protoplastes de cal pour les deux parents, l'analyse par CAPS chloroplastique d'une cinquantaine de plantes, régénérées à partir d'un plan d'hybridation diallèle entre quatre espèces (oranger, citronnier, mandarinier et pomelo), témoigne d'une ségrégation équilibrée des chloroplastes parentaux chez les hybrides somatiques (figure 7). Cette étude a par ailleurs permis d'identifier de nouveaux alloplastés (tableau 2).

Chez les agrumes, les cas de recombinaison des génomes cytoplasmiques apparaissent très rares. Ainsi, seules trois publications font état de recombinaisons mitochondriales. Les deux premières se rapportent à des travaux d'hybridation somatique asymétrique intergénérique entre *Citrus* et *Microcitrus* [20, 24], tandis que la troisième concerne une fusion symétrique intragénérique (Tangelo cv « Séminole » + Rough lemon) [74]. Cette sélection forte de structures non recombinaisonnées pourrait être liée au rôle des mitochondries dans le processus embryogénétique.

L'obtention, au niveau international, de nombreux alloplastés diploïdes et d'allotétraploïdes, possédant un même noyau hybride dans différents cytoplasmes, devrait apporter, dans les années qui

viennent, de précieuses informations sur les interactions nucléocytoplasmiques. Ces nouvelles connaissances pourraient ainsi relancer l'intérêt des manipulations cytoplasmiques pour la création variétale, d'autant que les transferts dirigés sont relativement aisés à piloter par des hybridations entre protoplastes de feuilles et protoplastes de cal.

Conclusion

Chez les agrumes, l'intérêt des hybridations somatiques symétriques pour l'exploitation de genres sexuellement incompatibles apparaît limité compte tenu de la difficulté à régénérer des plantes viables pour les combinaisons les plus éloignées (entre tribus et entre certaines sous-tribus) et de l'instabilité des génomes nucléaires qui semble liée à ces combinaisons. Par ailleurs, les hybrides entre espèces sexuellement incompatibles présentent généralement des caractères défavorables qu'il paraît difficile d'éliminer chez les agrumes par des cycles de recombinaison ultérieurs. La voie la plus prometteuse afin d'intégrer efficacement ces taxons aux ressources génétiques utiles est celle de l'hybridation asymétrique qui pourrait permettre, après irradiation ou traitement aux UV des protoplastes, de n'intégrer que quelques chromosomes ou fragments chromosomiques de l'espèce sauvage chez les hybrides.

L'hybridation somatique élargit, en revanche, considérablement la gamme des génotypes effectivement exploitables au sein des pools géniques primaires et secondaires. Elle permet en effet d'associer des caractères de deux parents apomictiques et d'intégrer le génome de cultivars totalement stériles chez des hybrides tétraploïdes fertiles. La synthèse directe, par fusion de protoplastes diploïdes et haploïdes, de cultivars triploïdes produisant des fruits sans pépins ouvre par ailleurs la voie à la valorisation de nombreux cultivars traditionnels adaptés aux contraintes pédoclimatiques et sanitaires locales ainsi qu'aux attentes qualitatives des consommateurs.

L'hybridation somatique autorise l'addition de l'ensemble des gènes de deux parents quels que soient leurs niveaux d'hétérozygotie. Au-delà de l'intérêt pour la création de porte-greffes, cette application ouvre des perspectives très intéressantes pour les analyses d'hérédité. Un plan de croisement diallèle entre des

cultivars représentatifs de six espèces du genre *Citrus* est ainsi en voie de finalisation au Cirad et permettra d'aborder prochainement l'analyse de l'hérédité de nombreux caractères de résistance ainsi que celle de certains facteurs de qualité comme les arômes. Ce plan de croisement a par ailleurs généré de multiples associations nucléocytoplasmiques, tant au niveau diploïde (alloplastés) que tétraploïde, qui vont permettre d'étudier l'influence des interactions entre noyau et cytoplasme sur l'expression des caractères. Les différents travaux d'hybridation symétrique conduisent de fait à générer ou enrichir des compartiments polyploïdes au sein d'un complexe d'espèces à l'origine essentiellement diploïdes. Cette manipulation de la ploïdie, recherchée dans le cadre de l'amélioration des cultivars, ou corollaire de la stratégie d'addition de caractères dominants chez les porte-greffes, devrait se traduire, dans les décennies à venir, par une modification considérable de la structure évolutive du complexe d'espèces et donc par une redéfinition des stratégies de conservation des ressources génétiques des agrumes ■

Références

1. Melchers G, Sacristan MD, Holder AA. Somatic plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res Comm* 1978 ; 43 : 203-18.
2. Bravo JE, Evans DA. Protoplast fusion for crop improvement. *Plant Breed Rev* 1985 ; 3 : 193-218.
3. Lefrançois C, Chudeau Y, Bourgin JP. Sexual and somatic hybridization in the genus *Lycopersicon*. *Theor Appl Genet* 1993 ; 86 : 533-46.
4. Grosser JW, Mourao-Fo FAA, Gmitter FG, et al. L. Allotetraploid hybrids between *Citrus* and seven related genera produced by somatic hybridization. *Theor Appl Genet* 1996 ; 92 : 577-82.
5. Masson J, Pelletier G. Contribution de l'hybridation somatique à l'amélioration de la pomme de terre. *CR Acad Agric Fr* 1987 ; 73 : 11-8.
6. Valkonen JPT, Xu YS, Rokka VM, Pulli S, Pehu E. Transfer of resistance to potato leafroll virus, potato virus Y and potato virus X from *Solanum brevidentis* to *S. tuberosum* through symmetric and designed asymmetric somatic hybridization. *Ann Appl Biol* 1994 ; 124 : 351-62.
7. Oberwalder B, Schilde-Rentschler L, Ruoß B, Wittmann S, Ninnemann H. Asymmetric protoplast fusions between wild species and breeding lines of potato - effect of recipients and genome stability. *Theor Appl Genet* 1998 ; 97 : 1347-54.
8. Glimelius K, Fahleson J, Landgren M, Sjödin C, Sundberg E. Gene transfer via somatic hybridization in plants. *TIBTech* 1991 ; 9 : 24-30.

9. Téoulé Y. Fusions de protoplastes et variabilité génétique. In : *Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes*. Paris, 1992 : 269-77.
10. Forsberg J, Lagercrantz U, Glimelius K. Comparison of UV light, X-ray and restriction enzyme treatment as tools in production of asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* 1998 ; 96 : 1178-85.
11. Dudits D, Fejer O, Hadlaczký Koncz GC, Lazar GB, Horváth G. Intergeneric gene transfer mediated by plant protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 1980 ; 179 : 283-8.
12. Dudits D, Maroy E, Praznovsky T, Olah Z, Gyorgyey J, Cella R. Transfer of resistance traits from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization : regeneration of fertile plants. *Nat Acad Sci* 1987 ; 84 : 8434-8.
13. Sjödin C, Glimenius K. Transfer of resistance against Phoma lingam to *Brassica napus* by asymmetric somatic hybridization combined with toxin selection. *Theor Appl Genet* 1989 ; 78 : 513-20.
14. Bates WG. Transfer of tobacco mosaic virus resistance by asymmetric protoplast fusion. In : Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J. *Progress in plant cellular and molecular biology*. Dordrecht : Kluwer Academic, 1990 : 293-8.
15. Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrit P, Remy R, Rousselle P, Renard M. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 1983 ; 191 : 244-50.
16. Kumar A, Cocking EC. Protoplast fusion : a novel approach to organelle genetics in higher plants. *Am J Bot* 1987 ; 74 : 1289-303.
17. Barsby TL, Chuong PV, Yarrow SA, Wu SC, et al. The combination of polima cms and cytoplasmic triazine resistance in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 1987 ; 73 : 809-14.
18. Thomzik JE, Hain R. Transfer and segregation of triazine tolerant chloroplasts in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 1988 ; 76 : 165-71.
19. Gupta PP, Schieder O, Gupta M. Intergeneric nuclear gene transfer between somatically and sexually incompatible plants through asymmetric protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 1984 ; 197 : 30-5.
20. Vardi A, Breiman A, Galun E. *Citrus* cybrids : production by donor-recipient protoplast fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. *Theor Appl Genet* 1987 ; 75 : 51-8.
21. Li YG, Tanner GJ, Delves AC, Larkin PJ. Asymmetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* L. (alfalfa, luzerne) and *Onobrychis viciifolia* Scop. (sainfoin). *Theor Appl Genet* 1993 ; 87 : 455-63.
22. Sidorov V, Menczel L, Nagy F, Maliga P. Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. *Planta* 1981 ; 152 : 341-5.
23. Galun E, Aviv D, Breiman A, Fromm H, Perl A, Vardi A. Cybrids in *Nicotiana*, *Solanum* and *Citrus* : isolation and characterization of plastone mutants, pre-fusion treatments, selection and analysis of cybrids. In : *Plant molecular biology*. New York : Plenum Press, 1987 : 199-207.
24. Vardi A, Arzee-Gonen P, Frydman-Shani A, Bleichman S, Galun E. Protoplast-fusion-mediated transfer of organelles from *Microcitrus* into *Citrus* and regeneration of novel alloplasmic trees. *Theor Appl Genet* 1989 ; 78 : 741-7.
25. Belliard G, Vedel F, Quetier F. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature* 1979 ; 281 : 401-3.
26. D'Hont A, Quetier F, Teoulé E, Dattée Y. Mitochondrial and chloroplast DNA analysis in interspecific somatic hybrids of *Medicago*. *Plant Sci* 1987 ; 53 : 287-8.
27. Rothenberg M, Boeshore ML, Hanson MR, Izhar S. Intergeneric recombination of mitochondrial genome in somatic hybrid plant. *Curr Genet* 1985 ; 9 : 615-8.
28. Samoylov VM, Izhar S, Sink KC. Donor chromosome elimination and organelle composition of asymmetric somatic plants between an interspecific tomato hybrid and eggplant. *Theor Appl Genet* 1996 ; 93 : 268-74.
29. Medgyest P, Fejes E, Maliga P. Interspecific chloroplast DNA in *Nicotiana* somatic hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 6960-4.
30. Kisaka H, Kisaka M, Kanno A, Kameya T. Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare* L.) and carrot (*Daucus carota* L.). *Theor Appl Genet* 1997 ; 94 : 221-6.
31. Ollitrault P, Luro F. Amélioration des agrumes et biotechnologie. *Fruits* 1995 ; 50 : 267-79.
32. Ohgawara T, Kobayashi S, Ohgawara E, Uchimiya H, Ishii S. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theor Appl Genet* 1985 ; 71 : 1-4.
33. Harlan JR, De Wet JMJ. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 1971 ; 20 : 509-17.
34. Ollitrault P, Faure X. Système de reproduction et organisation de la diversité génétique dans le genre *Citrus*. In : *Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes*. Paris : BRG, 1992 : 133-51.
35. Ollitrault P, Jacquemond C, Dubois C, Luro F. Les agrumes. In : *Diversité génétique des plantes tropicales cultivées*. Montpellier : Cirad, 1999 : 89-111.
36. Pernes J, Lourd M. Organisation des complexes d'espèces. In : *Gestion des ressources génétiques des plantes*. Paris : Agence de coopération culturelle et technique, 1984 : 7-108.
37. Iwamasa M, Nito N, Ling JT. Intra- and intergeneric hybridization in the orange subfamily, Auranthioideae. In : *Proc. 6th Int. Citrus Cong.*, Balaban, Philadelphia, 1988 : 123-30.
38. Nito N, Akihama T. Prospect of *Citrus* and related genera for disease resistant rootstock. In : *Asia Pacific International Conference on Citriculture*. Chiang Mai, Thailand, FAO-UNDP, 1990 : 39-47.
39. Ollitrault P, Dambier D, Cabasson C, Allent V, Engelmann F. Optimized management of *Citrus* embryogenic calli for breeding programmes. *Fruits* 1994 ; 49 : 394-7.
40. Kao KN, Michayluk MR. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 1974 ; 115 : 355-67.
41. Zimmermann U, Scheurch P. High frequency fusion of plant protoplasts by electric field. *Planta* 1981 ; 151 : 26-32.
42. Sihachakr D, Haicour R, Serraf I, et al. Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* CB Clark. *Plant Science* 1988 ; 57 : 215-23.
43. Ollitrault P, Dambier D, Sudahono, Luro F. Somatic hybridization in *Citrus* : some new hybrid and alloplasmic plants. In : *Proc Int Soc Citriculture* 1996 : 907-12.
44. Demesure B, Sodji N, Petit RJ. A set of universal primers for amplification of polymorphic non coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 1995 ; 4 : 129-31.
45. Escalante A, Imanishi S, Hossain M, Ohmido N, Fukui K. RFLP analysis and genomic *in situ* hybridization (GISH) in somatic hybrids and their progeny between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. *Theor Appl Genet* 1998 ; 96 : 719-26.
46. Buiteveld J, Suo Y, Lookeren Campagne MM, Creemers-Molenar J. Production and characterization of somatic hybrid plants between leek (*Allium ampeloprasum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). *Theor Appl Genet* 1998 ; 96 : 765-75.
47. Grosse JW, Gmitter FG, Louzada ES, Chandler JL. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless *Citrus* development. *HortScience* 1992 ; 27 : 1125-7.
48. Ohgawara T, Kobayashi S, Ishii S, Yoshinaga K, Oiyama I. Somatic hybridization in *Citrus* : navel orange (*C. sinensis* Obs.) and grapefruit (*C. paradisi* Macf.). *Theor Appl Genet* 1989 ; 78 : 609-12.
49. Grosse JW, Gmitter FG, Fleming GH, Chandler JL. Applications of biotechnology to *Citrus* cultivar improvement at the CREC. In : *1st International Citrus Biotechnology Symposium*. Act Hort (in press).
50. Ohgawara T, Kobayashi S, Ishii S, Yoshinaga K, Oiyama I. Fertile fruit trees obtained by somatic hybridization : navel orange (*Citrus sinensis*) and Troyer citrange (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*). *Theor Appl Genet* 1991 ; 81 : 141-3.
51. Froelicher Y. *Analyse de la diversité du genre Clausena et modalité de son exploitation en amélioration variétale*. Orsay, Paris Sud, Doctorat de l'Université, 1999 ; 150 p.
52. Ling JT, Iwamasa M. Somatic hybridization between *Citrus reticulata* and *Citropsis gabunensis* through electrofusion. *Plant Cell Rep* 1994 ; 13 : 493-7.
53. Hidaka T, Takayanagi R, Shinozaki S, Fujita K, Omura M. Somatic hybrids obtained by electro-fusion among *Citrus* and its wild relatives. *Plant Tissue Culture and Gene Manipulation for Breeding and Formation of Phytochemicals* 1992 : 225-35.
54. Guo WW, Deng XX. Somatic hybrid plantlets regeneration between *Citrus* and its wild relative, *Murraya paniculata* via protoplast electrofusion. *Plant Cell Reports* 1998 ; 18 : 297-300.
55. Guo WW, Deng XX. Intertribal hexaploid somatic hybrid plants regeneration from electrofusion between diploids of *Citrus sinensis* and its sexually incompatible relative, *Clausena lansium*. *Theor Appl Genet* 1999 ; 98 : 581-5.
56. Sundberg E, Glimelius K. Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae*. *Theor Appl Genet* 1991 ; 83 : 81-8.
57. Grosse JW, Gmitter FG, Sesto F, Deng XX, Chandler JL. Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement. *J Am Soc Hort Sci* 1992 ; 117 : 169-73.
58. Miranda M, Motomura T, Ikeda F, et al. Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. *Plant Cell Reports* 1997 ; 16 : 401-5.

59. Grosser JW, Gmitter FG. Protoplast fusion and *Citrus* improvement. *Plant Breeding Rev* 1990 ; vol : 339-74.
60. Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Bakry F, Aubert B. Rootstock breeding strategies for the Mediterranean *Citrus* industry ; the somatic hybridization potential. *Fruits* 1998 ; 53 : 335-44.
61. Grosser JW, Gmitter FG, Castle WS, Chandler JL. Somatic hybridization : a new approach to *Citrus* rootstock improvement. *Fruits* 1998 ; 53 : 331-4.
62. Esen A, Soost RK. Unexpected triploids in *Citrus* : their origin, identification and possible use. *J Hered* 1971 ; 62 : 329-33.
63. Starrantino A. Use of triploids for production of seedless cultivars in *Citrus* improvement programs. In : *VIIIth Int Citrus Cong. Italy* : Int Soc of Citriculture, 1992 : 117-21.
64. Ollitrault P, Dambier D, Sudahono, Mademba-Sy F, Vanel F, Luro F, Aubert B. Biotechnology for triploid mandarin breeding. *Fruits* 1998 ; 53 : 307-17.
65. Ollitrault P, Dambier D, Vanel F, Froelicher Y. Creation of triploid *Citrus* hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. In : *First International Citrus Biotechnology Symposium. Acta Hort* (in press).
66. Tusa N, Fatta Del Bosco S, Nardi L, Lucreti S. Obtaining triploid plants by crossing *Citrus limon* cv « Femminello » 2n_x4n allotetraploid somatic hybrids. In : *VIIIth Int Congress of Citriculture. South Africa* : Int Soc Citr, 1996 : 133-6.
67. Deng X, Yin H, Li F, Guo W, Ye W. Triploid *Citrus* plants obtained from crossing the diploids with allotetraploid somatic hybrids. *Acta Botanica Sinica* 1996 ; 38 : 631-6.
68. Ollitrault P, Allent V, Luro F. Production of haploid plants and embryogenic calli of clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after *in situ* parthenogenesis induced by irradiated pollen. In : *Proc Int Soc Citriculture* 1996 : 913-7.
69. Germanà MA. Haploidy in *Citrus*. In : *In vitro haploid production in higher plants. Vol 5 : Oil, Ornamental and Miscellaneous Plants. Dordrecht* : Kluwer Academic Publishers, 1997 : 195-217.
70. Maddi F. *Hybridations somatiques et gamétosomatiques chez les agrumes*. Rennes, Rennes 1, UFR Sciences de la vie et de l'environnement, Certificat d'université de biotechnologies, 1998 : 42.
71. Luro F, Cabasson C, Grosser J, Ollitrault P. Utilisation des marqueurs RFLP et de cytométrie en flux pour l'analyse génétique des plantes régénérées après fusion de protoplastes d'agrumes. In : *Symposium sur les mandarines. San Giuliano*, 1995.
72. Grosser JW, Gmitter FG, Tusa N, Reforgiato Recupero G, Cucinotta P. Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from *Citrus* leaf protoplasts following somatic fusion. *Plant Cell Reports* 1996 ; 15 : 672-6.
73. Moriguchi T, Hidaka T, Omura M, Motomura T, Akihama T. Genotype and parental combination influence efficiency of cybrid induction in *Citrus* by electrofusion. *HortScience* 1996 ; 31 : 275-8.
74. Moriguchi T, Motomura T, Hidaka T, Akihama T, Omura M. Analysis of mitochondrial genomes among *Citrus* plants produced by the interspecific somatic fusion of « Seminole » tangelo with rough lemon. *Plant Cell Reports* 1997 ; 16 : 397-400.
75. Kobayashi S, Ohgawara T, Fujiwara K, Oiyama I. Analysis of cytoplasmic genome in somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) and « Murcott » tangor. *Theor Appl Genet* 1991 ; 82 : 6-10.

Résumé

L'hybridation somatique permet d'accroître la diversité des pools géniques des espèces cultivées, non seulement en contournant les incompatibilités ou contraintes sexuelles, mais également en combinant les génomes nucléaires, chloroplastiques et mitochondriaux suivant de nouvelles règles. Elle trouve des applications importantes chez les agrumes compte tenu du caractère apomictique ou de la stérilité de nombreux cultivars et de la structure du complexe d'espèces. Les génomes de cultivars inexploitablement par voie sexuée ont ainsi été intégrés au sein d'hybrides tétraploïdes par fusion de protoplastes au polyéthylène glycol ou par électrofusion. Cette manipulation de la ploïdie *via* l'hybridation somatique, dont l'objectif final est la sélection de cultivars triploïdes aspermes, a permis d'enrichir considérablement le compartiment tétraploïde du complexe d'espèce. Elle s'applique également à la synthèse directe d'hybrides triploïdes par fusion de protoplastes haploïdes et diploïdes. L'addition de l'ensemble des gènes des deux parents quels que soient leurs niveaux d'hétérozygotie trouve une application majeure pour la création de porte-greffes cumulant des caractères de résistance. L'exploitation de la diversité de genres sexuellement incompatibles est en revanche moins utile compte tenu des défauts présentés par la majorité des hybrides. Dans ce cas, la mise en œuvre de programmes d'hybridations asymétriques paraît souhaitable pour n'introduire que quelques fragments du génome des espèces sauvages. Des alloplastés générés par hybridation symétrique ouvrent la voie à l'étude des interactions nucléo-cytoplasmiques. L'hybridation somatique entraîne une évolution majeure du pool génique des agrumes vers un complexe polyploïde.
