

Intérêt des marqueurs enzymatiques pour l'étude des agrumes.

I-Diversité enzymatique chez les genres *Citrus* et *Poncirus*.

Hypothèses de déterminisme génétique de huit systèmes enzymatiques.

F. NORMAND*

VALUE OF ENZYME MARKERS FOR CITRUS STUDY.

I.- Enzyme diversity in the *Citrus* and *Poncirus* genera. Hypothesis on genetic control for eight enzyme systems.

F. NORMAND.

Fruits, Oct. 1988, vol. 43, n° 10, p. 569-577.

ABSTRACT - As a result of enzyme electrophoresis analysis of 70 individuals which belong to the *Citrus* and *Poncirus* genera, or represent hybrids between these two genera, hypotheses have been put forward concerning genetic control for 8 enzyme systems : acid phosphatases (PAC), endopeptidases (ENDO), amylases (AMY), glutamate oxaloacetate transaminases (GOT), malate dehydrogenases (MDH), isocitrate dehydrogenases (IDH), phosphoglucose isomerases (PGI) and cathodic peroxidases (PEROX). Eleven loci and 31 alleles have been found. Allelic distribution between the *Citrus* and *Poncirus* genera shows total allelic segregation for PAC, AMY and IDH. It is suggested that this result be used for identifying zygotic plantlets in the progeny of *Poncirus* x *Citrus* crosses. The *Poncirus* genus seems to be very homogeneous, from the genetic standpoint, for the markers studied, whereas the *Citrus* genus is heterogeneous.

INTRODUCTION

Les agrumes, dont les principaux groupes agronomiques sont le genre *Poncirus* et le sous-genre *Eucitrus* auquel appartiennent les *Citrus* à fruits comestibles, ont une grande importance économique. En effet, ils représentent la première production fruitière mondiale devant les bananes et les pommes (FAO, 1986).

Outre le caractère pérenne de ces cultures, les problèmes liés à la polyembryonie, aux facilités d'hybridation intra et intergénérique et au taux élevé de mutations spontanées, représentent des éléments importants dont il faut tenir compte dans le développement de programmes d'amélioration-sélection, de multiplication ou dans les études de taxonomie.

INTERET DES MARQUEURS ENZYMATIQUES POUR L'ETUDE DES AGRUMES.

I.- Diversité enzymatique chez les genres *Citrus* et *Poncirus*.

Hypothèses de déterminisme génétique de huit systèmes enzymatiques.

F. NORMAND.

Fruits, Oct. 1988, vol. 43 n° 10, p. 569-577.

RESUME - L'analyse par électrophorèse enzymatique de 70 individus appartenant aux genres *Citrus* et *Poncirus*, ou représentant des hybrides entre ces deux genres, a permis de proposer des hypothèses de déterminisme génétique pour 8 systèmes enzymatiques : les phosphatases acides (PAC), les endopeptidases (ENDO), les amylases (AMY), les glutamate oxaloacétate transaminases (GOT), les malate déshydrogénases (MDH), les isocitrate déshydrogénases (IDH), les phosphoglucose isomérases (PGI) et les peroxydases cathodiques (PEROX). Onze locus et 31 allèles ont été mis en évidence. La distribution allélique entre les genres *Citrus* et *Poncirus* montre une ségrégation allélique totale pour les PAC, les AMY et les IDH. L'utilisation de ce résultat est proposée pour l'identification des plantules zygotiques dans la descendance de croisements *Poncirus* x *Citrus*. Le genre *Poncirus* apparaît très homogène génétiquement pour les marqueurs étudiés alors que le genre *Citrus* est hétérogène.

l'identification des plantules zygotiques dans la descendance de croisements *Poncirus* x *Citrus*. Le genre *Poncirus* apparaît très homogène génétiquement pour les marqueurs étudiés alors que le genre *Citrus* est hétérogène.

La recherche de marqueurs pour essayer de résoudre ces différents problèmes apparaît alors nécessaire. L'électrophorèse enzymatique permet l'identification de marqueurs à déterminisme génétique simple (allèles codominants) et qui sont présents dans la plupart des tissus végétaux. L'utilisation de jeunes feuilles donne la possibilité de travailler à des stades précoces du développement.

Les zymogrammes observés sont parfois complexes, avec un nombre élevé de bandes. Il est important de faire la différence entre les allozymes (qui correspondent au produit direct d'un ou de plusieurs gènes) et les autres isozymes (visualisés par des bandes secondaires) qui n'ont pas de signification génétique et qui sont dues à des modifications post-traductionnelles de chaînes polypeptidiques (HARRIS).

* - Station IRFA/CIRAD de Bassin-Martin B.P. 180
97455 SAINT PIERRE CEDEX (La Réunion).

et HOPKINSON, 1976). Ceci évite de manipuler des descriptions complexes de zymogrammes, alors que seulement quelques bandes ont une signification génétique. Il est donc important de connaître le déterminisme génétique des systèmes enzymatiques étudiés. Plusieurs auteurs ont déjà travaillé sur ce sujet, notamment TORRES *et al.* (1978), SOOST et TORRES (1981) et TORRES *et al.* (1982).

D'autre part, il faut s'attacher à rechercher des systèmes enzymatiques polymorphes afin de pouvoir mettre en évidence des différences entre populations, ou identifier plus facilement et de façon sûre les plantules zygotiques dans des croisements.

L'objet de cette étude est de proposer des hypothèses sur le déterminisme génétique de huit systèmes enzymatiques : les endopeptidases (ENDO), les phosphatases acides (PAC), les amylases (AMY), les isocitrate déshydrogénases (IDH), les malate déshydrogénases (MDH), les peroxydases cathodiques (PEROX), les glutamate oxaloacétate transaminases (GOT) et les phosphoglucose isomérases (PGI) ; et d'évaluer la diversité enzymatique des genres *Citrus* et *Poncirus*.

MATERIEL ET METHODE

Nous avons analysé 40 individus du genre *Poncirus* représentant 8 types morphologiques, 9 individus du genre *Citrus* représentant les espèces *Citrus intermedia*, *Citrus grandis*, *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata* BLANCO et 21 hybrides intergénériques représentant les 3 types de croisement : *Citrus reticulata* BLANCO x *Poncirus*, *Citrus sinensis* x *Poncirus* et *Citrus paradisi* MACF. x *Poncirus*. Tous sont des porte-greffe d'un essai nouvellement planté à la SRA de San Giuliano en Corse à l'exception du clone de *Citrus reticulata* BLANCO SRA 85. Des rejets ont été induits par une incision en « ^ » au-dessus d'un oeil. La liste détaillée des 70 individus est donnée en annexe 1. De jeunes feuilles ont été prélevées, lavées puis lyophilisées et conservées à -18°C jusqu'à utilisation.

Les protéines sont extraites sur une pailasse réfrigérée à 4°C pour éviter leur dégradation. 45 mg de feuilles lyophilisées, soit l'équivalent de 300 mg de feuilles fraîches, sont broyées dans un mortier, avec 1 ml de solution d'extraction contenant de la cystéine 0.2 M et du saccharose 1.17 M en solution dans de l'eau distillée. Un peu de sable purifié facilite le broyage. Celui-ci est suivi d'une centrifugation de 20 mn à 49 000 g et à 4°C. Le surnageant est récupéré et aliquoté dans des microtubes qui seront conservés à -18°C jusqu'à utilisation.

Les méthodes de migration et les solutions de révélation sont données dans les tableaux 1 et 2 respectivement.

Un zymogramme se présente sous forme de bandes colorées sur le gel. La charge et la conformation spatiale d'une molécule définissent, dans des conditions de migration données, sa mobilité électrophorétique, et donc sa position lors de l'arrêt de la migration. Les enzymes sont le plus souvent formés d'une ou deux chaînes polypeptidiques appelées sous-unités, et ont une structure monomérique ou dimérique respectivement. Les bandes alléliques représentent des molécules constituées de sous-unités codées par l'allèle correspondant. Dans le cas d'un enzyme à structure monomérique, le zymogramme d'un hétérozygote montrera deux bandes correspondant chacune à un allèle. Dans le cas d'un enzyme à structure dimérique, le zymogramme d'un hétérozygote montrera deux bandes constituées des sous-unités codées par chacun des allèles (homodimères), et une bande intermédiaire constituée par l'hybridation de sous-unités de chacun des allèles (hétérodimère) (figure 1). En général, le zymogramme d'un homozygote ne présente qu'une seule bande, sauf cas de dédoublement des bandes alléliques ou accompagnement par des bandes secondaires.

Pour chaque système enzymatique, le ou les locus sont nommés par l'abréviation du système enzymatique (par exemple PAC), suivi d'une lettre A, B ou C du plus lent au plus rapide s'il y en a plusieurs. Pour chaque locus, les allèles sont numérotés par ordre croissant du plus lent au plus rapide selon la nomenclature internationale (IUB, 1984).

RESULTATS ET DISCUSSION

Hypothèses du déterminisme génétique des systèmes enzymatiques étudiés.

Ces hypothèses sont déduites de l'observation des différents zymogrammes obtenus qui montraient un certain polymorphisme.

La figure 2 donne pour chaque système enzymatique le zymogramme de chacun des homozygotes pour tous les allèles afin de montrer leur position relative, puis le zymogramme d'un hétérozygote qui montre la structure monomérique ou dimérique de l'enzyme au locus considéré.

- Les ENDO : les gels montrent une zone de coloration avec une ou deux bandes qui correspondraient à un locus codant pour un enzyme à structure monomérique. Trois

FIGURE 1 - Relations entre la structure de l'enzyme et le zymogramme observé en fonction de l'état homozygote ou hétérozygote du locus codant.

	enzyme monomérique	enzyme dimérique
locus homozygote allèle A	— a	— a
locus hétérozygote allèles A et B	— a — b	— aa — ab — bb

a : sous-unité codée par l'allèle A b : sous-unité codée par l'allèle B

TABLEAU 1 - Techniques et systèmes de migrations utilisés.

Enzyme	Système de migration	Tampon gel	Tampon électrode	Intensité par gel	Voltage	Durée de migration	Extrait	Bibliographie
ENDO GOT	acrylamide continu 11 %	Tris 0.9M Borate 0.89 M EDTA 0.025 M pH 8.3 (TBE)	TBE dilué 10x	25 mA maxi	300 V constant	6 heures	20 μ l	PEACOCK et DINGMAN 1967 (modifié)
PAC AMY	acrylamide discontinu	gel fin: Tris. 1.88M + HCL- pH 8.7 gel large : Tris. 0.6M + HCL- pH 6.7	Tris 0.07M Glycine 0.53M + HCL- pH 8.6	25 mA 350 Hz 45 premières minutes	300 V 500 Hz	3 heures	20 μ l	ORNSTEIN 1964 DAVIS 1964
IDH MDH	amidon continu 12 %	Tris 0.135M Ac. citrique 0.043M pH 7 (TC7) dilué 20x	TC7	45 mA maxi	190 V maxi	6 heures	15 μ l	SOOST et TORRES 1981 (modifié)
PEROX PGI	amidon discontinu 12 %	TC7	NaOH 0.06M Borate 0.3 M pH 8.2	25 mA maxi	210 V maxi	6 heures	15 μ l	TORRES <i>et al.</i> 1978 (modifié)

TABLEAU 2 - Solutions de révélation.

Enzyme	Solution de révélation	Bibliographie
ENDO	15 mg N α Benzoyl DL Arginine β Naphtylamide (BANA) ; 1 ml MgCl ₂ 0.1M ; 1 ml NaCl 1M ; 50 mg Fast Black K ; 20 ml tampon Tris Maléate 0.1 M pH 5.4 ; H ₂ O 50 ml QSP	CARDY <i>et al.</i> 1980 (modifié)
PAC	100 mg α Naphtyl Acide Phosphate ; 50 mg Fast Garnet ; 20 ml tampon acétate 0.5M pH 5 ; H ₂ O 50 ml QSP	SECOND et TROUSLOT 1980 (modifié)
AMY	500 mg amidon soluble ; 5 ml tampon acétate 0.5M pH 5 ; H ₂ O bouillante 50 ml QSP. Après incubation de 35 mn à 40 °C, rincer et verser de la solution d'iode (I ₂ 0.01 M KI 0.036 M)	VALLEJOS 1983 (modifié)
GOT	200 mg Polyvinyl Polypyrrolidone (PVP) ; 50 mg EDTA ; 100 mg acide Aspartique ; 50 mg acide α kétoglutarique ; 7.5 mg Pyridoxal 5' Phosphate ; 50 mg Fast Blue BB ; 20 ml tampon Tris HCl 0.5 M pH 8 ; H ₂ O 50 ml QSP.	CARDY <i>et al.</i> 1980 (modifié)
MDH	10 ml solution de malate 1 M ; 1 ml Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) 0.015 M ; 1 ml Nitro Blue Tétrazolium (NBT) 0.012 M ; 1 ml Phénazine Méthosulfate (PMS) 0.0032 M ; 20 ml tampon Tris HCl 0.5 M pH 8.5 ; H ₂ O 50 ml QSP	SECOND et TROUSLOT 1980 (modifié)
IDH	200 mg Isocitrate de sodium ; 1 ml MgCl ₂ 0.4 M ; 1 ml Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADP) 0.0065 M ; 1 ml NBT 0.012 M ; 1 ml PMS 0.0032M ; 20 ml tampon Tris HCl 0.5M pH 8.5 ; H ₂ O 50 ml QSP.	SECOND et TROUSLOT 1980 (modifié)
PGI	100 mg Fructose 6 Phosphate ; 1 ml MgCl ₂ 0.4 M ; 1 ml NADP 0.0065 M ; 1 ml NBT 0.012 M ; 1 ml PMS 0.0032 M ; 20 μ l Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase (G6PDH) 2U/ μ l ; 20 ml tampon Tris HCl 0.5 M pH 8.5 ; 25 ml solution d'agar à 2 %	SECOND et TROUSLOT 1980 (modifié)
PEROX	30 mg 3-amino-9-éthyl-carbazol ; 0.5 ml CaCl ₂ 1 M ; 0.1 ml H ₂ O ₂ 3 % / 5 ml tampon acétate 0.5 M pH 5 ; H ₂ O 50 ml QSP.	SECOND et TROUSLOT 1980 (modifié)

TABLEAU 3 - Génotypes des individus analysés.

	ENDO	PAC	AMY	IDH	PEROX B	PEROX C	GOT A	GOT B	MDH A	MDH B	PGI A
P.t. Large flower (6)	1-1	2-2	1-2	3-3	1-2	2-2	3-5	1-3	1-1	1-2	1-2
P.t. CRC 858 (2)	1-1	2-2	1-1	3-3	1-2	2-2	3-5	1-3	1-1	1-2	1-2
P.t. Flying Dragon (7)	1-1	2-2	1-1	3-3	1-2	2-2	3-5	1-3	1-2	1-2	1-2
P.t. Marks Missip. (6)	1-1	2-2	1-2	3-3	1-2	2-2	3-5	1-3	1-1	1-2	1-2
P.t. Pomeroy SRA B1b (12)	1-1	2-2	1-2	3-3	1-2	2-2	3-5	1-3	1-1	1-2	1-2
P.t. Commun Japon (3)	1-1	2-2	1-1	3-3	1-2	2-2	3-5	1-3	1-1	1-2	1-2
P.t. Feu. moy. Japon (1)	?	2-2	1-1	3-3	1-2	2-2	?	?	1-1	1-2	?
P.t. Feu. Large Japon (3)	?	2-2	1-1	?	1-2	2-2	?	?	1-1	1-2	?
Mand. Cléo.xP.t.Swingle 30573 (2)	1-3	1-2	2-4	2-3	1-1	1-2	2-3	1-3	1-1	1-2	1-2
Mand. Sunki xP.t. Swingle 30591 (2)	1-3	1-1	1-4	2-3	2-2	2-2	2-5	1-2	1-2	1-2	1-2
Mand. SunkixP.t. Swingle 30586 (1)	?	1-2	2-4	?	2-2	2-2	2-5	1-1	1-1	1-2	2-2
Mand. Cléo.xC. Carrizo 30577 (2)	1-3	1-2	1-4	2-3	2-2	2-2	1-3	3-4	1-2	1-2	1-2
Citrange Bowman 33821 (1)	2-2	1-1	1-4	?	1-1	2-2	3-5	1-1	1-1	1-2	?
Citrange Troyer 31655 (3)	1-2	1-2	1-4	1-3	2-2	2-2	2-5	3-3	1-2	1-2	1-1
Citrange Carrizo SRA (5)	1-2	1-2	1-4	1-3	2-2	2-2	2-3	3-3	1-2	1-2	1-1
Citrandarin 6956 (2)	1-1	1-1	1-4	2-3	2-2	2-2	2-5	3-3	1-2	1-2	1-2
Citrumelo Winter Haven (3)	?	1-2	1-4	2-3	1-1	2-2	2-3	3-3	1-2	2-2	1-1
<i>Citrus intermedia</i> (2)	1-1	1-1	3-4	2-2	2-2	2-2	1-4	3-3	2-2	2-2	1-2
Cuban Shaddock (<i>Citrus grandis</i>) (4)	1-1	1-1	4-4	1-2	2-2	2-2	3-3	1-4*	1-2	2-2	1-1
Bigaradier Maroc (<i>Citrus aurantium</i>) (2)	1-1	1-1	4-4	2-2	2-2	2-2	2-2	3-4	2-2	2-2	?
Clémentinier SRA 85 (<i>Citrus reticulata</i>) (1)	3-3	1-1	4-4	1-2	2-2	2-2	1-1	3-4	2-2	2-2	1-2

() : nombre d'individus analysés

* : structure dimérique au locus GOT B

? : zymogramme non lisible

Etude des génotypes des individus observés.

Quelques remarques se dégagent de l'étude du tableau 3 :

- les huit types de *Poncirus trifoliata* présentent le même génotype aux locus étudiés, sauf pour les AMY où l'on trouve des homozygotes 1-1 et des hétérozygotes 1-2. Le *Poncirus trifoliata* Flying Dragon se démarque en étant hétérozygote 1-2 au locus MDH-A. Le genre *Poncirus* paraît être bien homogène génétiquement.

- les quatre espèces de *Citrus* étudiées montrent des différences entre leurs génotypes aux locus étudiés, et les trois systèmes enzymatiques ENDO, AMY et IDH suffisent à les caractériser. Il semble que le genre *Citrus* soit donc beaucoup plus hétérogène génétiquement que le genre *Poncirus*.

Cette différence de diversité dans les deux genres rejoint le problème de la taxonomie et la nécessité de distinguer plusieurs espèces dans le genre *Citrus* alors que le genre *Poncirus* ne comporte qu'une seule espèce : *Poncirus trifoliata* L. RAFF.

- les hybrides présentent des génotypes variés aux locus étudiés. Quelques anomalies sont constatées chez ces hybrides ; en effet ils présentent des combinaisons alléliques différentes de celles attendues si l'on considère que les génotypes de leurs parents correspondent à ceux de la même espèce ou du même genre rassemblés dans le tableau 3. Seuls les génotypes des parents exacts permettraient de les expliquer.

La plupart de ces hybrides font intervenir le parent *Citrus reticulata*. Le génotype donné dans le tableau 3, et qui a servi de référence pour détecter des anomalies, est

celui du clone de clémentinier SRA 85. Les parents femelles des croisements précédents sont le mandarinier Sunki et le mandarinier Cléopâtre. Il est inconnu pour le citrandarin. L'espèce *Citrus reticulata* est très hétérogène, tant au niveau des aspects morphologiques et agronomiques des arbres qu'au niveau génétique (TORRES *et al.* 1978). Il est possible que ces anomalies soient dues aux variations des génotypes au sein de cette espèce. Les anomalies dues au parent *Poncirus trifoliata* sont plus difficilement explicables, le genre *Poncirus* semblant bien homogène génétiquement pour les locus étudiés.

Certains allèles sont rares : les allèles AMY 3 et GOT-A 4 que l'on ne trouve que chez *Citrus intermedia*, et l'allèle GOT-B 2 que l'on ne trouve que chez les descendants du croisement mandarinier Sunki x *Poncirus trifoliata* SWINGLE 30591.

Distribution des allèles entre les genres *Citrus* et *Poncirus*.

Le tableau 3 peut être condensé en un tableau de distribution allélique entre les genres *Citrus* et *Poncirus* (tableau 4). Le nombre peu élevé d'individus étudiés ne nous permet pas de généraliser, mais quelques points importants sont à remarquer :

- les locus PAC, AMY et IDH ont des allèles différents chez les *Citrus* et les *Poncirus* étudiés.
- les locus ENDO, PEROX-B, GOT-A, GOT-B, MDH-B présentent une ségrégation de certains allèles entre les *Citrus* et les *Poncirus* étudiés.
- les locus PEROX-C, MDH-A et PGI-A possèdent les mêmes allèles chez les *Citrus* et les *Poncirus* étudiés. Cependant, l'allèle MDH-A 2 n'est présent que chez le Flying Dragon dans le genre *Poncirus*, les autres étant tous homozygotes 1-1.

Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été réalisée (figure 3) sur 61 individus (ceux qui n'ont pas de génotype manquant à certains locus, plus le Bigaradier du Maroc) avec comme variables les allèles de tous les locus à l'exception de PGI-A car le génotype de ce locus n'est pas connu pour le Bigaradier du Maroc. Les allèles sont codés en fonction de leur part dans le génotype de chaque locus, c'est-à-dire 1 pour l'allèle d'un homozygote, 0,5 pour chaque allèle d'un hétérozygote, et 0 lorsque l'allèle n'est pas présent.

Elle permet de nettement mettre en évidence trois

groupes : les *Citrus*, les *Poncirus* et les hybrides qui se positionnent entre les deux premiers groupes, leurs allèles étant un mélange d'allèles de ces deux genres. L'étude des variables montre que l'axe 1 est surtout défini par les allèles PAC 1, AMY 4 et IDH2, et l'axe 2 par les allèles AMY 3, GOT-A 4, ENDO 2 et GOT-A 1. Ce sont donc surtout les allèles PAC 1, AMY 4 et IDH 2 qui définissent les groupes.

L'AFC montre aussi la plus grande diversité qui existe dans le genre *Citrus* dont les différents éléments sont relativement dispersés par rapport aux *Poncirus* qui sont très groupés. La grande dispersion des hybrides est due au hasard du mélange des allèles des genres *Citrus* et *Poncirus*.

CONCLUSION

Les hypothèses de déterminisme génétique des 8 systèmes enzymatiques étudiés ont permis d'identifier 11 locus et 31 allèles. Le genre *Poncirus* apparaît bien homogène génétiquement pour les locus analysés, alors que le genre *Citrus* est hétérogène. Certains allèles sont propres à chacun des genres.

Ces résultats présentent un intérêt certain pour l'identification des plantules nucellaires et zygotiques dans des croisements, ainsi que pour des études de taxonomie.

Le caractère trifolié dominant des *Poncirus* ne permet que difficilement d'identifier les individus zygotiques et les individus nucellaires à des stades juvéniles lors de croisements *Poncirus* x *Citrus*. Une généralisation des résultats précédents permettrait de proposer une technique rapide, simple, peu coûteuse et fiable à 100 p. 100 pour identifier tous les individus zygotiques lors de tels croisements par électrophorèse enzymatique des PAC, des AMY ou des IDH qui présentent une ségrégation allélique totale entre les deux genres.

Lors de prospections ou de récupérations de matériel végétal, l'étude des PAC, des AMY ou des IDH par électrophorèse enzymatique à partir de feuilles permettrait de classer rapidement et de façon sûre un individu trifolié dans le genre *Poncirus* ou de le considérer comme étant un hybride intergénérique. Une large étude des génotypes de plusieurs espèces du genre *Citrus* permettrait peut-être également d'avoir une idée sur le type d'hybride dont il s'agit.

La vérification des hypothèses précédentes par des croisements contrôlés et l'étude des descendances est indispensable afin d'avoir des bases solides pour toute étude

TABLEAU 4 - Distribution des allèles observés entre les genres *Citrus* et *Poncirus*.

	ENDO	PAC	AMY	IDH	PEROX-B	PEROX-C	GOT-A	GOT-B	MDH-A	MDH-B	PGI-A
<i>Poncirus trifoliata</i>			1		1		3	1	1	1	1
8 types	1	2		3		2					
40 individus			2		2		5	3	2	2	2
<i>Citrus</i>	1		3	1			1 2	1 3	1		1
4 espèces		1			2	2				2	
9 individus	3		4	2			3 4	4	2		2

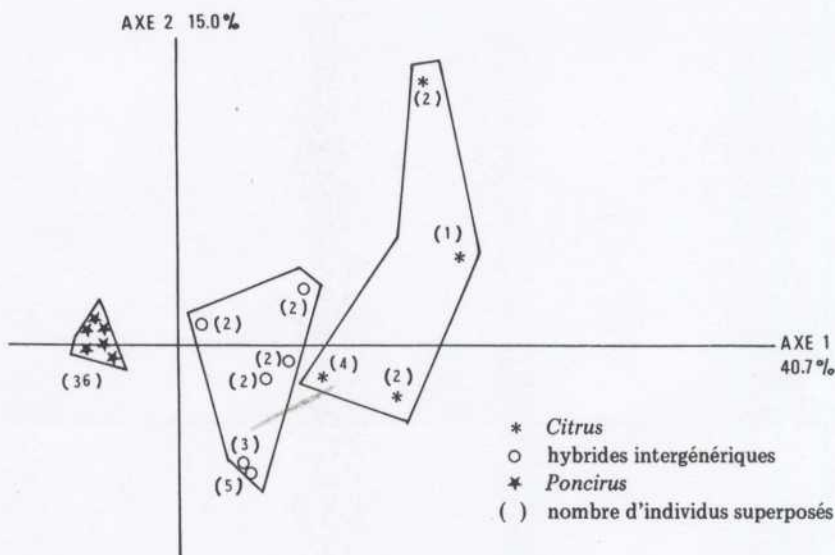


FIGURE 3 - Projection des *Citrus*, *Poncirus* et hybrides intergénériques analysés sur le premier plan de l'AFC

utilisant des marqueurs enzymatiques. L'analyse des descendance permettrait aussi de repérer d'éventuels linkages.

La recherche de nouveaux systèmes enzymatiques présentant un bon polymorphisme inter ou intragénérique, mais aussi intraspécifique, est une voie intéressante afin de pouvoir travailler avec un nombre élevé de marqueurs.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement M. François LELIEVRE, directeur de la SRA de Corse qui a financé cette étude, et Mademoiselle Claire LANAUD qui m'a accueilli dans le laboratoire d'électrophorèse du CIRAD à Montpellier.

ANNEXE 1 - Liste des types de *Poncirus*, des espèces de *Citrus* et des hybrides intergénériques analysés.

Poncirus trifoliata Large Flower
Poncirus trifoliata C.R.C. 858
Poncirus trifoliata Flying Dragon
Poncirus trifoliata Marks Mississippi
Poncirus Pomeroy SRA B1b
Poncirus trifoliata Feuilles moyennes Japon
Poncirus trifoliata Type Commun Japon
Poncirus trifoliata Feuilles larges Japon
30573 - Mandarinier Cléopâtre x *Poncirus trifoliata* SWINGLE F1
30586 - Mandarinier Sunki x *Poncirus trifoliata* SWINGLE
30591 - Mandarinier Sunki x *Poncirus trifoliata* SWINGLE
30577 - Mandarinier Cléopâtre x Citrange Carrizo
Citrange Bowman
Citrange Troyer 31655
Citrange Carrizo SRA
Citrandarin 6956
Citrumelo Winter Haven
Citrus intermedia
Cuban Shaddock (*Citrus grandis*)
Bigaradier Maroc (*Citrus aurantium*)
Citrus reticulata BLANCO SRA 85

BIBLIOGRAPHIE

- CARDY (B.J.), STUBER (C.W.) et GOODMAN (M.M.). 1980.
Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.).
Institute of Statistics Mimeograph Series n° 1317. Dec. 1980.
North Carolina State University.
- DAVIS (B.J.). 1964.
Disc electrophoresis.
II. Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427.
- HARRIS (H.) et HOPKINSON (D.A.). 1976.
Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics.
North Holland Publish. Co. Amsterdam.
- IUB 1984.
Enzyme nomenclature.
Harcourt, Brace Jovanovich, publishers. Academic Press, Inc. (London) Ltd., 646 p.
- LANAUD (C.). 1987.
Nouvelles données sur la biologie du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) : diversité des populations, systèmes d'incompatibilité, haploïdes spontanés. Leurs conséquences pour l'amélioration génétique de cette espèce.
Thèse de docteur d'Etat, Université de Paris Sud Orsay, 230 p.
- ORNSTEIN (L.). 1964.
Disc electrophoresis.
I. Background and theory.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 321-349.
- PEACOCK (A.C.) et DINGMAM (C.W.). 1967.
Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochemistry, 6, 1818-1827.
- SECOND (G.) et TROUSLOT (P.). 1980.
Electrophorèse d'enzymes de riz (*Oryza* sp.).
Travaux et documents de l'ORSTOM n° 120.
- SOOST (R.K.) et TORRES (A.M.). 1981.
Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*.
Proc. Int. Soc. Citriculture, vol. 1, 7-10.
- TORRES (A.M.), SOOST (R.K.) et DIEDENHOFEN (U.). 1978.
Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*.
Amer. J. Bot., 65 (8), 869-881.
- TORRES (A.M.), SOOST (R.K.) et MAU-LASTOVICKA (T.). 1982.
Citrus isozymes : genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings.
The Journal of Heredity, 73, 335-339.
- VALLEJOS (C.E.). 1983.
Enzyme activity staining.
In Isozymes in plant genetics and breeding Part A. S.D. TANK-SLEY and T.J. ORTON (Ed.), 469-516.

BEDEUTUNG DER ENZYM-MARKIERER FÜR DAS STUDIUM VON ZITRUSFRÜCHTEN.

I. Enzymvielfalt bei den Arten *Citrus* und *Poncirus*.
Annahmen zum genetischen Determinismus von acht Enzymsystemen.
F. NORMAND.
Fruits, Oct. 1988, vol. 43, n° 10, p. 559-567.

KURZFASSUNG - Im Wege der Enzym-Elektrophorese wurden 70 Einzelpflanzen der Arten *Citrus* und *Poncirus* bzw. Hybriden beider Arten analysiert und Hypothesen zum genetischen Determinismus für 8 Enzymsysteme formuliert : die sauren Phosphatasen (PAC), die Endopeptidasen (ENDO), die Amylasen (AMY), die Glutamat-Oxaloacetat-Transaminasen (GOT), die Malat-Deshydrasen (MDH), die Isozitrat-Deshydrasen (IDH), die Phosphoglucose-Isomerasen (PGI) und die katalytischen Peroxydasen (PEROX). Elf Loci und 31 Allele wurden nachgewiesen. Die Streuung der Allele zwischen den Arten *Citrus* und *Poncirus* verweist auf eine totale Spaltung derselben für die Enzymsysteme PAC, AMY und IDH. Es wird vorgeschlagen, dieses Ergebnis zur Identifizierung der zygotischen Keimpflanzen in der Nachkommenschaft aus Kreuzungen von *Poncirus* und *Citrus* zu verwenden. Die Art *Poncirus* erweist sich gegenüber den untersuchten Markierern genetisch als ausserordentlich homogen, während die Art *Citrus* heterogen ist.

INTERES DE LOS MARCADORES ENZIMATICOS PARA EL ESTUDIO DE LOS AGRIOS.

I. Diversidad enzimática en los géneros *Citrus* y *Poncirus*.
Hipótesis de determinismo genético de ocho sistemas enzimáticos.
F. NORMAND.
Fruits, Oct. 1988, vol. 43, n° 10, p. 569-577.

RESUMEN - El análisis por electroforesis enzimática de 70 individuos que pertenecen a los géneros *Citrus* y *Poncirus*, o que representan híbridos entre estos dos géneros, ha permitido proponer hipótesis de determinismo genético para 8 sistemas enzimáticos : las fosfatasas ácidas (PAC), las endopeptidasas (ENDO), las amilasas (AMY), las glutamato oxaloacetato transaminasas (GOT), las malato deshidrogenasas (MDH), las isocitrato deshidrogenasas (IDH), las fosfoglucoasa isomerasas (PGI) y las peroxidases catódicas (PEROX). Se han puesto en evidencia 11 locus y 31 alelos. La distribución alélica entre los géneros *Citrus* y *Poncirus* muestra una segregación alélica total para las PAC, las AMY y las IDH. La utilización de este resultado se propone para la identificación de las plántulas zigóticas en la descendencia de cruzamientos *Poncirus* x *Citrus*. El género *Poncirus* aparece muy homogéneo genéticamente para los marcadores estudiados mientras que el género *Citrus* es heterogéneo.