

Les hybridations intergénériques entre *Poncirus trifoliata* L. RAF. et *Citrus meyeri* Y. TAN. ou *Tangelo nova*.

La détermination par l'électrophorèse des embryons zygotiques ou nucléaires chez les plantes issues des hybridations *P. trifoliata* x *Tangelo nova*.

G. ABDULLAH, M. COUMANS, P. VILLEMUR et R. JONARD

INTERGENERIC HYBRIDIZATION BETWEEN *PONCIRUS TRIFOLIATA* L. RAF. AND *CITRUS MEYERI* Y. TAN. OR *TANGELO NOVA*.

Electrophoretic determination of zygotic or nucellar embryos from the cross *P. trifoliata* x *Tangelo nova*.

G. ABDULLAH, M. COUMANS, P. VILLEMUR and R. JONARD.

Fruits, Nov.-Dec. 1990, vol. 45, n° 6, p. 591-597.

ABSTRACT - Intergeneric crosses were performed between *Poncirus trifoliata* L. RAF., and *Citrus meyeri* Y. TAN. or *Tangelo «nova»*. Hybrid plantlets were only obtained between *P. trifoliata* and *Tangelo «nova»* through mature seed germination *in vitro* or 3 months old immature embryo rescue.

Hybrid plantlets can be distinguished from plants of nucellar origin by morphologic observations of the leaf shape. A clear confirmation can be through: by gel electrophoresis using 3 enzymatic systems: phosphoglucomutases, malate deshydrogenases and isocitrate deshydrogenases.

LES HYBRIDATIONS INTERGENERIQUES ENTRE *PONCIRUS TRIFOLIATA* L. RAF. ET *CITRUS MEYERI* Y. TAN. OU *TANGELO NOVA*.

La détermination par l'électrophorèse des embryons zygotiques ou nucléaires chez les plantes issues des hybridations *P. trifoliata* x *Tangelo nova*.

G. ABDULLAH, M. COUMANS, P. VILLEMUR et R. JONARD.

Fruits, Nov.-Dec. 1990, vol. 45, n° 6, p. 591-597.

RESUME - Des croisements intergénériques ont été effectués entre *Poncirus trifoliata* L. RAF. et *Citrus meyeri* Y. TAN. ou *Tangelo «nova»*. Des hybrides entre *P. trifoliata* et *Tangelo nova* sont obtenus par la germination *in vitro* de graines mûres ou par le sauvetage des embryons immatures âgés de 3 mois. La distinction entre les plantules hybrides d'origine zygotique et celles d'origine nucléaire peut se réaliser par l'observation morphologique des feuilles.

Cependant, seule une séparation par électrophorèse des isozymes de 3 familles enzymatiques: Phosphoglucomutases, Malate déshydrogénases et Isocitrate déshydrogénases peut apporter une confirmation claire et sans équivoque sur l'origine des embryons.

Mots clés : *Citrus*, *Poncirus*, Electrophorèse, Hybridation intergénérique, Culture d'embryon, *In vitro*.

INTRODUCTION

Les Agrumes (Rutacées), représentent en volume et en valeur, la première production fruitière mondiale (FAO, 1988). Les espèces d'agrumes d'intérêt économique sont généralement greffées, en raison entre autres de leur sensibilité aux conditions de l'environnement et à de nombreuses maladies (RAGHAVENDRA *et al.*, 1983 ; VOGEL et BOVE, 1986).

Parmi les porte-greffe utilisés, le *Poncirus trifoliata* et les Citranges : hybrides entre *Poncirus trifoliata* et *Citrus sinensis* OSB., offrent des potentialités intéressantes pour la région méditerranéenne en raison de leurs caractéristiques : résistance au froid (TUTBERIDZE, 1969, 1972 ; BLONDEL, 1974 ; BLONDEL et LE BOURDELLES, 1981), tolérance au virus de la Tristeza ou CTV (BLONDEL, 1967 ; TANAKA, 1969), à la moisissure *Phytophthora parasitica* et au nématode *Tylenchulus semipenetrans* (HUTCHISON, 1985). De plus, le *P. trifoliata* est considéré par JACQUEMOND (1984) comme étant probablement l'espèce la moins polymorphe parmi les agrumes.

* - ABDULLAH, COUMANS et VILLEMUR - Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée - Université Montpellier II - Place Eugène Bataillon - 34090 MONTPELLIER.
JONARD - Laboratoire d'Arboriculture Fruitière ENSA de Montpellier 9 place Viala - 34060 MONTPELLIER.

Cependant, au sein de l'espèce *P. trifoliata* L. RAF., des variations ont été observées depuis longtemps concer-

nant la morphologie des fleurs et la vigueur de l'arbre (SWINGLE, 1948). C'est la raison pour laquelle on trouve plusieurs populations bien différenciées de *Poncirus trifoliata* dans le monde. De plus, au sein d'une même population, JACQUEMOND en 1984 a observé des différences morphologiques assez importantes qui l'ont amené, par suite de la grande hétérogénéité du matériel de départ, à constituer une collection de clones de *Poncirus trifoliata* pour la Corse.

Les hybrides entre *Poncirus trifoliata* et *Citrus sinensis* OSB. utilisés comme porte-greffe, outre les qualités inhérentes au *Poncirus*, permettent d'améliorer les performances agronomiques des *Citrus* greffés (JACQUEMOND, 1984).

Le phénomène de polyembryonie ou développement au sein d'une même graine de plusieurs embryons dont un zygotique et les autres nucellaires (FROST et SOOST, 1968), est fréquent chez le *Poncirus trifoliata* comme chez beaucoup d'espèces du genre *Citrus*. Pour des impératifs de sélection et pour la multiplication conforme du porte-greffe, il est indispensable de pouvoir distinguer les embryons zygotiques des embryons d'origine nucellaire qui ont conservé le génome maternel.

Les caractères morphologiques permettent rarement de déterminer clairement l'origine de la formation des embryons et la supériorité de la technique des isozymes sur les autres méthodes disponibles a déjà été démontrée dans le cas des *Citrus* (TORRES *et al.*, 1978 ; NORMAND, 1988 ; KHAN et ROOS, 1988).

Ce travail reprend les essais de croisements entre le *Poncirus trifoliata* et, soit le *Citrus meyeri* Y. TAN., utilisé pour la présence d'un marqueur anthocyané qui devrait permettre de différencier les plantules zygotiques des nucellaires, soit le *Tangelo nova*, ce qui pourrait permettre de combiner la résistance au froid du *P. trifoliata* avec les qualités agronomiques du *Tangelo nova*. L'objectif principal pour ces hybrides est l'amélioration de la comptabilité avec les différentes espèces et variétés de *Citrus* utilisées comme greffons.

MATERIEL ET METHODES

Le matériel employé provient du verger expérimental de la Station de Recherches Agronomiques de San Giuliano en Corse. Les anthères non déhiscentes de *Tangelo nova* (*C. clementina* HORT. ex. TAN., x *Tangelo orlando*), et de *Citrus meyeri* Y. TAN., ont été récoltées sur des plantes à floraison précoce élevées en serre. Elles sont placées en conditions asséchantes dans des boîtes de Pétri ; le pollen ainsi obtenu est appliqué au verger sur différents clones de *Poncirus trifoliata* dont les origines sont présentées dans le tableau 1.

La pollinisation a été réalisée après castration et les fleurs isolées dans un manchon afin d'éviter les contaminations par les pollens étrangers. Des comptages et prélèvements de fruits sont effectués tous les mois.

Lorsque les embryons sont mis en culture *in vitro* avant maturité, les fruits âgés de 2 à 3 mois sont stérilisés selon la séquence suivante : après un premier rinçage à l'eau ordi-

TABLEAU 1 - Les origines des plantes utilisées.

Numéros	Noms	Origine
Z 13	<i>P. trifoliata</i> Jacompon	USA, Californie
R 14	Krides	USA, Floride
R 15	Krides	USA, Floride
Z 19	Pomero	USA, Californie
Z 24	Rubidou	USA, Californie
	<i>Pollinisateur</i>	
SRA 158	<i>T. nova</i>	USA, Floride
SRA 292	<i>C. meyeri</i>	USA, Californie

naire, le trempage dans une solution de mercryl à 20 p. 100, pendant 3 mn, puis dans une solution d'éthanol à 70 p. 100 pendant 5 mn est suivi d'un second rinçage à l'eau distillée, puis d'un traitement par l'hypochlorite de Ca à 10 p. 100 pendant 30 mn, enfin de 3 rinçages à l'eau distillée stérile.

Le milieu utilisé pour la culture des embryons est composé des macro et microéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962), complétés par les vitamines de MURASHIGE et TUCKER (1969) et additionnés d'extrait de malt à 500 mg l⁻¹, et de sulfate d'adénine à 25 mg l⁻¹ ; l'acide gibbérellique à 1 mg l⁻¹ est ajouté par une filtration stérile après autoclavage.

Les graines mûres sont débarrassées de leur premier tégument, désinfectées dans l'hypochlorite de calcium à 9 p. 100 pendant 25 mn, puis rincées 3 fois à l'eau distillée stérile. Le milieu de germination renferme les macro et microéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962) avec 100 mg l⁻¹ de myo inositol et 0,4 mg l⁻¹ de thiamine. Pour les 2 milieux de culture, le pH est ajusté à 5,7 après avoir ajouté la gelrite (3,3 g l⁻¹) et le saccharose (50 g l⁻¹). Le milieu est autoclavé à 110°C pendant 20 mn.

Les embryons immatures sont prélevés sous la loupe binoculaire par incision des téguments d'un côté et par compression délicate de la graine. Ils sont placés pendant les 7 premiers jours de la culture à 30°C et à l'obscurité puis à 25°C et à la lumière, sous une photopériode de 16 h et un éclairage de 500 ergs cm² sec⁻¹.

Les plantules lorsqu'elles ont atteint 5 cm de longueur sont acclimatées en serre en conditions d'atmosphère initialement saturée en eau, puis dégressive.

Neuf systèmes enzymatiques différents (tableau 2) ont été essayés pour déterminer l'origine zygotique ou nucellaire des plantules obtenues.

Trois cents mg de feuilles fraîches ont été prélevés sur des jeunes plantes en serre issues d'*in vitro* ainsi que sur des plantes mères puis broyées dans un mortier, en présence de polyclar AT et de 1 ml d'une solution d'extraction contenant : cystéine (0,2 M), Tris HCl à pH 7,2 (0,2 M) et Triton 0,15 p. 100 en solution dans l'eau distillée. Après centrifugation à 4°C pendant 20 mn à 49 000 g, le surnageant sera directement utilisé pour l'électrophorèse.

TABLEAU 2 - Systèmes de migration utilisés et systèmes enzymatiques révélés.

Supports	Systèmes de migration	Systèmes révélés
Amidon	TC7 (Tris-Citrate pH 7) continu	Isocitrate-déshydrogénases (IDH) Malate déshydrogénases (MDH)
	discontinu TC7 (T. gel) NaOH-Borate pH 8,2 (T. électrode)	Phosphoglucose isomérases (PGI) Phosphoglucomutases (PGM) Peroxydases (PEROX)
Acrylamide	TBE (Tris-borate-EDTA) continu	Endopeptidases (ENDO) Glutamate Oxaloacétate-Transaminases (GOT)
	AOD (Acrylamide-Orstein Davis) discontinu (HAMES, 1982)	Amylase (AMY) Phosphatases Acides (PAC)

Deux systèmes de migration ont été utilisés : l'un horizontal en gel d'amidon à 12 p. 100 (en continu et discontinu) l'autre vertical en gel de polyacrylamide (en continu à 11 p. 100 et discontinu). Les précisions sur ces deux systèmes d'électrophorèse utilisés ainsi que les révélations spécifiques des systèmes enzymatiques ont été décrites antérieurement par plusieurs chercheurs (HARRIS et HOPKINSON, 1976 ; TORRES *et al.*, 1978 ; NORMAND 1987 et 1988).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les croisements : entre *Poncirus trifoliata* et *C. meyeri*, ou entre *P. trifoliata* et *Tangelo nova*.

- Les prélèvements des graines sont réalisés sur les fruits arrivés à maturité.

Les observations notées dans le tableau 3 présentent le nombre de graines mûres et de plantes obtenues lors de ces

essais de croisements intergénériques entre *Poncirus trifoliata* et *C. meyeri* ou *Tangelo nova*, réalisés en 1986 et 1987, en utilisant *P. trifoliata* comme parent femelle. Les pourcentages de fruits développés 1 mois après la pollinisation ont été de 57 p. 100 en 1986 et de 92 p. 100 en 1987. A maturité, 5 mois après la pollinisation, la plupart des fruits ont avorté (chute) ; en 1986 sur les 7 fruits qui restaient, aucune graine n'a pu être récoltée pour les 2 types de croisement. En 1987, par contre, pour le croisement *P. trifoliata* x *Tangelo nova*, une vingtaine de fruits ont fourni 151 graines. Et leur développement pour 38 d'entre elles a produit 44 plantes viables.

- Le développement de plantes à partir d'embryons immatures cultivés *in vitro*.

Toujours pour la même année 1987, des essais de sauvetage d'embryons immatures ont été effectués sur des fruits prélevés 2 à 3 mois après pollinisation. Des ovules ont également été isolés après 2 mois.

TABLEAU 3 - Résultats des croisements intergénériques entre *Poncirus trifoliata* et *Citrus meyeri* ou *Tangelo nova*.

Parents Femelle	Mâle	Fleurs	Fruits		Graines	Graines germées	Plantes
			1 mois	5 mois			
Année 1986							
<i>P. trifoliata</i>							
Z 13	<i>C. meyeri</i>	67	52	2	0	0	0
R 14	<i>C. meyeri</i>	21	0	0	0	0	0
Z 24	<i>C. meyeri</i>	77	41	2	0	0	0
R 14	<i>T. nova</i>	118	65	2	0	0	0
Z 19	<i>T. nova</i>	88	54	1	0	0	0
Total		371	212 (57 %)	7 (2 %)	0	0	0
Année 1987							
<i>P. trifoliata</i>							
Z 13	<i>C. meyeri</i>	60	51	1	0	0	0
R 14	<i>C. meyeri</i>	53	49	2	0	0	0
Z 24	<i>C. meyeri</i>	92	89	5	0	0	0
R 14	<i>T. nova</i>	77	75	9	86	17	18
Z 19	<i>T. nova</i>	91	82	11	65	21	26
Total		374	346 (92 %)	28 (7,5 %)	151	38	44



Photo 1 - Plantes issues des croisements entre *Poncirus trifoliata* et *Tangelo nova*.

A) d'origine nucellaire.
B et C) d'origines hybrides.

Photo 2 - Les différences de tailles et de formes des feuilles notées chez les parents (P et T) et dans leur descendance (H)

(P) *Poncirus trifoliata* (T) *Tangelo nova* (H) individus hybrides.

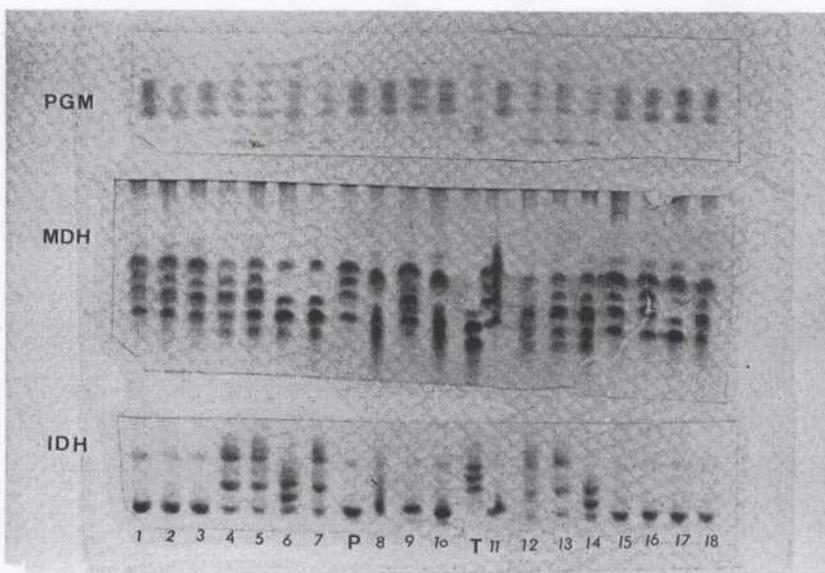
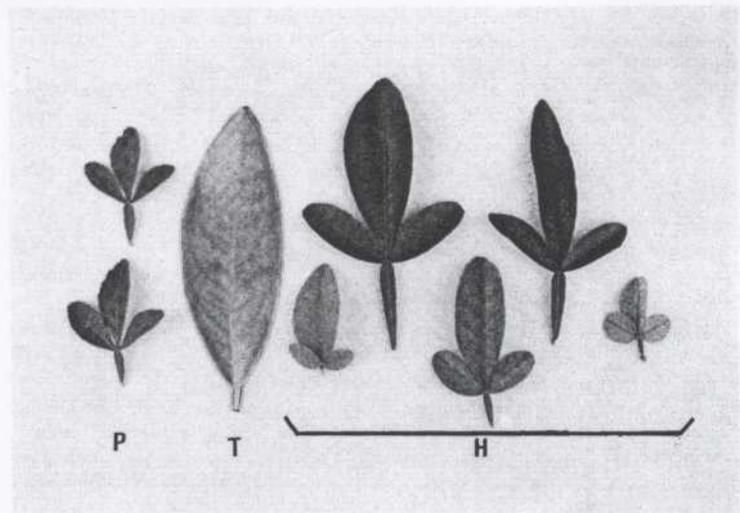


Photo 3 - Représentation des zymogrammes obtenus pour 3 systèmes enzymatiques.

(PGM = phospho-gluco-mutases
MDH = malate déshydrogénases et
IDH = isocitrate-déshydrogénases).
Sur les 2 parents *Poncirus trifoliata* (P) et *Tangelo nova* (T) et sur 18 plantes issues de leurs croisements.

Les numéros 1, 2, 3, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 18, correspondent à des plantes nucellaires de *P. trifoliata* et les numéros 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14 correspondent à des plantes hybrides.

TABLEAU 4 - Résultats des croisements intergénériques entre *Poncirus trifoliata* et *Citrus meyeri* ou *Tangelo nova* obtenus après sauvetage d'embryons 3 mois après la pollinisation.

Parents		Fruits prélevés	Graines immatures	Nombre d'embryons	Plantes en serre
Femelle	Mâle				
<i>P. trifoliata</i>					
Z 13	<i>C. meyeri</i>	2	0	0	0
R 14	<i>C. meyeri</i>	3	0	0	0
Z 24	<i>C. meyeri</i>	2	0	0	0
R 14	<i>T. nova</i>	1	5	18	15
		1	0		
Z 19	<i>T. nova</i>	1	8	16	16
		2	0		
Total		12	13	34	31

Le tableau 4 expose les résultats obtenus sur des fruits prélevés 3 mois après la pollinisation.

Aucune graine n'a été trouvée dans les fruits provenant des croisements avec *C. meyeri* ; par contre, 2 des 5 fruits prélevés à partir de croisements avec *Tangelo nova* possédaient 13 graines immatures normales.

A partir des 34 embryons dénombrés, 31 plantes ont été obtenues. En comparant les techniques d'obtention d'hybrides et bien que la technique par sauvetage d'embryons n'ait été essayée que sur un petit nombre de graines, il apparaît que cette dernière se montre la plus efficace. En effet, après croisement et maturation classiques, 0,29 plante a été obtenue par graine alors que le sauvetage d'embryons permet de récupérer une moyenne de 2,4 plantes par graine, ce qui augmente grandement les chances de développement d'éventuels embryons zygotiques hybrides.

Souvent, des embryons secondaires se sont développés à partir des tissus de l'ovule soit directement, soit par l'intermédiaire de cals.

Les 31 plantes obtenues à la suite des croisements entre *P. trifoliata* et *Tangelo nova*, ont été acclimatées en serre. La photo 1 montre 3 des plantes issues de ces croisements.

Aucune plante n'a pu être obtenue après les croisements entre *P. trifoliata* L. RAF. et *C. meyeri*. Il semblerait qu'il y ait une barrière d'incompatibilité plus grande entre ces deux espèces qu'entre *P. trifoliata* et *Tangelo nova* ; cependant, étant donné que des clones différents ont été utilisés pour ces essais de croisement, il n'est pas impossible qu'il y ait un effet clone également, R14 et Z19 pouvant être plus compatibles que les clones croisés avec *C. meyeri*.

Des hybrides entre *Citrus limon* L. BRUM., et d'autres espèces de *Citrus* ont été également obtenus en isolant des graines 3 à 4 mois après la pollinisation en culture *in vitro* par STARRANTINO *et al.*, en 1981.

La détermination de l'origine des embryons.

L'origine des embryons, zygotique ou nucellaire, a pu être déterminée dans la plupart des cas par une analyse morphologique des feuilles.

La photo 2 montre des feuilles de *Poncirus trifoliata* (P), une feuille entière de *Tangelo nova* (T) et 5 feuilles intermédiaires provenant de 5 plantes considérées comme des hybrides : ces feuilles à trois folioles comme chez le *Poncirus trifoliata* présentent cependant une forme et des dimensions de folioles différentes.

Dans la photo 1, la plante de gauche (A) est semblable au parent *Poncirus trifoliata*, celle du centre (B) et celle de droite (C) ont des aspects morphologiques d'hybrides.

Une confirmation de l'origine des embryons, soit zygotique soit nucellaire, a été apportée par l'étude des électrophorogrammes de divers systèmes enzymatiques sur les 75 hybrides obtenus par ces 2 techniques entre *P. trifoliata* et *Tangelo nova*. Sur les 9 systèmes testés, des différences ont été observées pour 5 d'entre eux : Amylases, PAC, PGM, MDH, IDH ; chacun de ces systèmes permet de faire la distinction entre les embryons de type nucellaire dont les zymogrammes sont semblables à celui de *Poncirus trifoliata* et l'embryon zygotique, aux comportements intermédiaires entre les 2 parents (PGM, MDH, IDH représentées dans la photo 3).

Dans ce cas de croisement intergénérique (*Poncirus x Citrus*), les zygotiques sont repérables grâce à ces 5 systèmes qui possèdent des allèles différents dans les deux genres. L'analyse d'un seul système enzymatique (IDH) pourrait être suffisante dans la mesure où le *Poncirus* et le *Tangelo nova* n'ont pas d'allèles en commun pour ce locus.

Ces 5 systèmes enzymatiques ont déjà été utilisés avec succès chez les *Citrus* comme marqueurs variétaux (SOOST et TORRES, 1981 ; ASHARI *et al.*, 1989), ou comme moyen d'identification d'embryons zygotiques ou nucléaires (GERACI *et al.*, 1981 ; NORMAND, 1988 ; ROOSE et TRAUGH, 1988).

Sur les 44 plantes obtenues par germination de graines issues des fruits arrivés à maturité, 31 sont d'origine zygotique et 13 d'origine nucellaire. Par mise en culture des embryons immatures nous avons obtenu 11 plants hybrides et 20 nucléaires.

Tous les embryons obtenus par la culture d'ovules après 2 mois ont montré des profils électrophorétiques

semblables à ceux du *Poncirus trifoliata*, il s'agit donc d'embryons somatiques sans doute d'origine nucellaire comme démontré par MOBAYASHI *et al.*, 1987.

Tous les hybrides obtenus vont être transférés dans les vergers de la station de San Giuliano en Corse afin de suivre non seulement leur développement, mais aussi leurs qualités comme porte-greffe vis-à-vis du Clémentinier.

CONCLUSIONS

Des hybridations sexuées ont été réussies entre *Poncirus trifoliata* L. RAF. et *Tangelo nova*, alors que la fécondation de *Poncirus trifoliata* par du pollen de *Citrus meyeri* n'a pas été couronnée de succès. L'efficacité du croisement est améliorée lorsque les embryons sont prélevés 3 mois après la fécondation et transférés sur un milieu de germination et de croissance *in vitro*. Un prélèvement plus précoce des ovules «fécondés» après 2 mois a donné des embryons somatiques ou des calcs embryogènes.

Une analyse morphologique a permis de mettre en évidence des différences entre les parents et les hybrides au niveau des structures foliaires.

L'identité du caractère hybride a pu être clairement confirmée sur une partie des plantes ainsi obtenues en observant les isozymes de 3 familles enzymatiques : les phosphoglucomutases, les malate-déshydrogénases et les isocitrate-déshydrogénases. Dans ce cas précis, l'électrophorèse d'isozyme peut donc être utilisée, à côté de techniques plus sophistiquées telles que l'utilisation d'anticorps monoclonaux de protéines spécifiques à chacun des parents (immunoblotting) ou l'application de sondes moléculaires aux ligneux fruitiers (OLLITRAULT, 1989).

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué grâce à une bourse du Gouvernement syrien. Je tiens à remercier tout particulièrement Melle Claire LANAUD qui m'a accueilli dans le laboratoire AGETROP du CIRAD à Montpellier et MM. C. JACQUEMOND et P. OLLITRAULT pour leur aide et leur conseils.

Reçu en mai 1990
Accepté en octobre 1990

BIBLIOGRAPHIE

- ASHARI (S.), ASPINALI (D.) and SEDGLEY (M.). 1989.
Identification and investigation of relationships of Mandarin types using isozyme analysis.
Scientia Horticulturae, 40, 305-315.
- BLONDEL (L.). 1967.
Quelques aspects généraux du remplacement du Bigaradier et de l'utilisation de porte-greffe nouveaux.
Fruits, 22 (1), 19-26.
- BLONDEL (L.). 1974.
Résistance au froid conférée aux *Citrus* par certains porte-greffe.
Fruits, 29 (3), 209-213.
- BLONDEL (L.) et LE BOURDELLES (J.). 1981.
Protection antigel des plantations d'agrumes et d'avocats en Corse.
Tirés à part de la *Revue Somivac*, oct. 1981, n° 100, 10 p.
- FAO. 1988.
Sommaire statistique de la production agricole mondiale et régionale.
Annuaire de 1988, 350 p.
- FROST (H.B.) and SOOST (R.K.). 1968.
Seed reproduction development of gametes and embryos.
in *Citrus Industry*, vol. II, Ed. Reuther W., Batchelor L.D. and Webber H.J., 290-324.
- GARNSEY (S.M.), BAR-JOSEPH (M.) and LEE (R.F.). 1981.
Applications of serological indexing to develop control strategies for *Citrus Tristeza virus*.
Proc. Int. Soc. Citriculture, 1981, vol. 1, 12-16.
- GERACI (G.), MANZOCCHI (L.A.), TUSA (N.), OCCORSO (G.)
RADOONA (L.) and De PASQUALE (F.). 1981.
Comparison of different methods for identifying zygotic and nucellar seedling in *Citrus*.
Proc. Int. Soc. Citriculture, vol. I, 1-4.
- HAMES (B.D.). 1982.
An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis.
in : B.D. Hames and D. Rickwood (Ed.). *Gel electrophoresis of proteins : a practical approach* : 1-91. Ed. IRL, press. England.
- HARRIS (H.) and HOPKINSON (D.A.). 1976.
Handbook of enzyme electrophoresis in Human Genetics.
North Holland Publishing Company, Amsterdam, 332 p.
- HUTCHISON (J.). 1985.
Rootstock development screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics.
Fruit Varieties J., 39 (3), 21-25.
- JACQUEMOND (C.). 1984.
Contribution à l'étude des porte-greffe des agrumes, le *Poncirus trifoliata*.
Thèse d'Université. Agronomie «Phytotechnie» USTL - Montpellier 49 p.
- KHAN (I.A.) and ROOSE (M.I.). 1988.
Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings, in three cultivars of *Trifoliata orange*.
J. Amer. Soc. Hort. Sci., 113 (1), 105-110.
- MOBAYASHI (S.), IEDA (I.) and NAKATANI (M.). 1987.
Role of the primordium cell in nucellar embryogenesis in *Citrus*.
in : *Proc. Int. Soc. Citriculture 1987*, vol. 1, 44-48.
- NORMAND (F.). 1987.
Utilisation des marqueurs enzymatiques pour l'étude génétique des genres *Citrus* et *Poncirus*.
Mémoire de D.A.A., ENSA Montpellier, 60 p.
- NORMAND (F.). 1988 a.
Intérêt des marqueurs enzymatiques pour l'étude des agrumes. I. Diversité enzymatique chez les genres *Citrus* et *Poncirus*. Hypothèses du déterminisme génétique de huit systèmes enzymatiques.
Fruits, 43 (10), 569-577.
- NORMAND (F.). 1988 b.
Intérêt des marqueurs enzymatiques pour l'étude des agrumes. II. Application à l'étude génétique du genre *Poncirus*.
Fruits, 43 (11), 651-655.
- OLLITRAULT (P.). 1989.
Les marqueurs moléculaires : applications à l'amélioration des espèces fruitières.
Fruits, 44 (5), 243-250.
- RAGHAVENDRA RAO (N.N.) and PRASAD (M.B.N.V.). 1983.
Evaluation of strains of *Poncirus trifoliata* and *Trifoliata orange* hybrids for resistance to *Phytophthora root*.
Scientia Horticulturae, 20, 85-90.
- ROOSE (M.L.) and TRAUGH (S.N.). 1988.
Identification and performance of *Citrus* trees on nucellar and zygotic rootstocks.
J. Amer. Soc. Hort. Sci., 113 (1), 100-105.
- SOOST (R.K.) and TORRES (A.M.). 1981.
Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*.
Proc. Int. Soc. Citriculture, vol. 1, 7-10.

- STARRANTINO (A.) and REFORGIATO RECUPERO (G.). 1981.**
Citrus hybrids obtained in vitro from 2X females X 4X males.
Proc. Int. Soc. Citriculture, 1981, vol. 1, 31-32.
- SWINGLE (W.T.). 1948.**
The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange Subfamily.
Citrus Industry (chap. IV), University of California, Press.
Berkeley and Los Angeles, 611 p.
- TANAKA (Y.). 1969.**
***Citrus* rootstock problems in Japon.**
Proceed. First Intern. Citrus Symposium, Riverside, Jan 1969,
vol. 1, 407-410.
- TORRES (A.M.), SOOST (R.K.) and DIEDENHOFEN (U.). 1978.**
Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*.
Amer. J. Bot., 65 (8), 869-881.
- TUTBERIDZE (B.D.). 1969.**
Caractéristiques morphologiques de diverses formes sélectionnées du porte-greffe de *Poncirus trifoliata*.
Subtropicheskie kulytury, Makharadze, Georgie (SUKUA),
n° 3, 144-151.
- TUTBERIDZE (B.D.). 1972.**
Résultats d'un essai de qualité de porte-greffe de type vigoureux et faible du *Poncirus trifoliata*.
Subtropicheskie kulytury, Makharadze, Georgie (SUKUA),
n° 2, 171-176.
- VOGEL (R.) et BOVE (J.M.). 1986.**
Influence de l'Exocortis sur la croissance et la production du Clémentinier greffé sur 39 lignées de *Poncirus trifoliata*.
Fruits, 41 (11), 639-647.

LAS HIBRIDACIONES INTERGENERICAS ENTRE *PONCIRUS TRIFOLIATA* L. RAF Y *CITRUS MEYERI* Y. TAN O TANGELO NOVA.

La determinación por la electroforesis de los embriones zigóticos o nucleares en las plantas procedentes de hibridaciones *P. trifoliata* x *Tangelo nova*.

G. ABDULLAH, M. COUMANS, P. VILLEMUR y R. JONARD.

Fruits, Nov.-Dec. 1990, vol. 45, n° 6, p. 591-597.

RESUMEN - Se han efectuado cruzamientos intergenéticos entre *Poncirus trifoliata* L. RAF y *Citrus meyeri* Y. TAN o *Tangelo nova*. Se obtienen híbridos entre *P. trifoliata* y *Tangelo nova* por la germinación *in vitro* de semillas maduras o por el salvamento de embriones inmaduros de 3 meses de edad. La distinción entre las plántulas híbridadas de origen zigótico y las de origen nuclear puede realizarse mediante la observación morfológica de las hojas.

No obstante, sólo una separación por electroforesis de las isozimas de 3 familias enzimáticas: Fosfoglucomutasas, Malato deshidrogenasas e Isocitrato deshidrogenasas puede aportar una confirmación clara y sin equívoco sobre el origen de los embriones.