

L'amélioration des agrumes : II-Créations variétales et biotechnologies.

P. OLLITRAULT et Dominique de ROCCA SERRA*

**CITRUS BREEDING :
II.- GENETIC IMPROVEMENT AND BIOTECHNOLOGY.**

P. OLLITRAULT and Dominique de Rocca SERRA.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p.124-134.

ABSTRACT - After reviewing the main objectives assigned to citrus breeding programs, this article summarizes the main results obtained since the beginning of this century.

The major procedures for selecting specific traits are presented with special emphasis on new biotechnologies such as genetic mapping, protoplast management and somatic embryogenesis, that are expected to make a breakthrough in the coming years.

Les agrumes représentent la première production fruitière mondiale : 64,5 millions de tonnes en 1988-1989 (FAO, 1990). Le volume de fruits transformés est évalué à 22 millions de tonnes, soit près de 35 p. 100 de la production totale, et est en constante augmentation. Le jus d'orange concentré congelé absorbe une grande partie de la production des Etats-Unis et l'essentiel de celle du Brésil. Récemment, le marché d'agrumes d'ornement en pot a également pris de l'ampleur, particulièrement en Europe du Nord. L'étendue de l'aire agrumicole actuelle est également très vaste puisqu'elle se situe approximativement entre les 40° degrés de latitude Nord et Sud, tout autour du Monde.

Les programmes de création variétale doivent donc répondre à une double diversité : 1) diversité des contraintes liées à l'utilisation des agrumes ; 2) diversité des contraintes pédoclimatiques et parasitaires rencontrées sur l'aire de culture. L'association porte-greffe/cultivar permet dans une certaine mesure de travailler les premières contraintes au niveau des cultivars et les secondes au niveau des porte-greffe. Des résistances ou tolérances à certaines maladies ou attaques parasitaires doivent, toutefois, être également recherchées pour les cultivars. De plus l'existence d'interac-

**L'AMELIORATION DES AGRUMES :
II.- CREATIONS VARIETALES ET BIOTECHNOLOGIES.**

P. OLLITRAULT et Dominique de ROCCA SERRA.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p.124-134.

RESUME - Après un rappel des objectifs des programmes de création variétale, ce travail fait le point sur près d'un siècle d'amélioration génétique des agrumes. Les critères et méthodes de sélection sont présentés sur la base d'une synthèse bibliographique avec une mention particulière aux biotechnologies (marquage moléculaire, embryogenèse somatique, protoplastes ...) qui pourraient, dans un proche avenir, déboucher sur des progrès génétiques notables.

tion porte-greffe/cultivar ne permet pas, pour certains caractères, de considérer les performances de l'association sous un modèle additif.

Ce papier tente de faire un point bibliographique, sur les objectifs des programmes d'amélioration des cultivars et des porte-greffe, ainsi que sur les méthodes employées pour y parvenir.

PROPAGATION ET STRUCTURES VARIETALES

Les techniques de multiplication et les structures variétales sont deux éléments de base dans l'établissement des schémas d'amélioration de nombreuses espèces. La multiplication végétative, lorsqu'elle est possible, autorise la plus grande souplesse, puisqu'elle permet la multiplication conforme de génotypes élités quels que soient leurs niveaux d'hétérozygotie.

Dans le Sud-est asiatique, aire d'origine des agrumes, subsistent des zones d'agrumiculture traditionnelle où les agrumes sont cultivés sur leurs propres racines, et multipliés soit par marcotte, soit par semis pour les cultivars polyembryonnés. Ces méthodes de propagation ont de nombreux désavantages :

* - SRA San Giuliano, CIRAD-IRFA INRA - 20230 SAN NICOLAO Haute Corse

Le marcottage présente de grands risques de dissémination des maladies virales et bactériennes, et offre un taux de multiplication faible. Le semis, quant à lui, est pénalisé par l'expression des caractères de juvénilité et va, par ailleurs, à l'encontre de la recherche de cultivars à fruits aspermes. Enfin, la culture franc de pied nécessite de regrouper dans un même génotype les caractères relatifs aux fruits et les caractères de résistance aux maladies ou d'adaptation aux sols.

C'est pourquoi, en plantation commerciale, les agrumes, comme la majorité des arbres fruitiers, se présentent sous forme d'un complexe cultivar/porte-greffe.

La multiplication des porte-greffe est classiquement réalisée par semis de graines polyembryonnées. Des problèmes de conformité peuvent se poser pour certains génotypes compte tenu du caractère partiel de l'apomixie (entre 40 et 100 p. 100 suivant les porte-greffe et les conditions environnementales, ROOSE, 1988). Ainsi, la multiplication du *Poncirus* «Flying dragon», pour lequel le taux d'apomixie ne dépasse pas 50 p. 100, est très problématique.

Les cultivars sont, quant à eux, multipliés par greffage d'yeux ou par surgreffage. Cette dernière technique couramment utilisée en Espagne permet une rotation rapide et donc une meilleure adéquation avec le marché.

Que ce soit pour les porte-greffe ou les variétés, on a donc à faire à une propagation clonale de génotypes à l'hétérozygotie souvent élevée comme l'ont montré les études de diversité enzymatique (OLLITRAULT, 1990 a).

LES OBJECTIFS ET LES CRITERES DE SELECTION

La culture de plants greffés permet, dans une certaine mesure, de scinder les contraintes génétiques entre porte-greffe et cultivars. C'est un aspect important compte tenu de la grande diversité climatique et écologique rencontrée sur l'aire de culture des agrumes. Un cultivar sélectionné peut ainsi avoir une vocation étendue, tandis que les critères de sélection des porte-greffe varient de manière importante suivant les zones de production.

Objectifs de l'amélioration des cultivars.

Les objectifs de l'amélioration sont essentiellement fonction de l'utilisation des cultivars.

Pour la transformation, les principaux critères sont la productivité et à un moindre titre les teneurs en jus et en sucre ainsi que la nature des pigments.

Pour le marché du fruit frais, la qualité du produit est en passe de devenir le critère essentiel. La définition de la qualité organoleptique peut varier suivant les habitudes du consommateur. En Occident, elle est déterminée par l'arôme, la teneur en jus et en sucre ainsi que l'acidité qui doit être élevée pour les citrons et les limes et modérée pour les autres productions. En Asie, des fruits sans aucune acidité sont très prisés. L'aspermie (cf. encart n° 1), la facilité d'épluchage, la coloration interne et externe, et la régularité de l'écorce participent aussi à la définition de la qualité

du fruit. L'étalement de la production constitue également un objectif important des programmes de sélection.

Des caractères de résistances aux maladies sont également à rechercher. Le greening (pour les mandariniers, les orangers et leurs hybrides), le chancre citrique (pour les pomelos, les orangers et les agrumes acides), ou le mal secco (*Phoma tracheiphila*) pour les citronniers, causent en effet des dégâts considérables. La résistance au froid, enfin, a donné lieu à de nombreux travaux en Floride (BARRETT, 1982), au Japon (IDEDA *et al.*, 1980) et en URSS (KARAYA, 1981).

Le développement actuel d'un marché important pour les agrumes d'ornement, en pot, conduit à définir de nouveaux critères de sélection comme : un port en boule, une phase de juvénilité très courte, une floraison pluriannuelle, des fruits de petits calibres très colorés, ou un feuillage panaché.

Objectifs de l'amélioration des porte-greffe.

L'adaptation aux sols et aux pathogènes qui s'y trouvent sont les premiers objectifs qui guident la sélection des porte-greffe. Ainsi, suivant les types de sol, on recherche une tolérance au sel, une adaptation aux sols alcalins ou acides, et, dans tous les cas, une résistance ou une tolérance aux *Phytophthora* sp. et aux nématodes. En Floride, la recherche d'une résistance au «blight» (maladie de dégénérescence) est également devenue un objectif prioritaire (WUTSCHER, 1979).

Le génotype des porte-greffe permet de moduler le comportement de l'association porte-greffe/cultivar pour de nombreux caractères :

- La sélection de porte-greffe conférant à l'association, une résistance ou une tolérance à la Tristeza est une priorité pour toutes les zones de culture. En effet, cette maladie à virus a sans doute été la plus dommageable pour les plantations d'agrumes depuis les années 1950. Pour le Sud-est asiatique, la résistance au tatter leaf (maladie qui affecte le point de greffe) est un critère de sélection important (AUBERT, 1989).
- La résistance au froid de l'association constitue un objectif particulièrement important pour la Floride, le Japon ou la Géorgie, et peut être fortement améliorée par le porte-greffe (BLONDEL, 1974 b).
- La vigueur de la partie aérienne et la productivité sont également affectées par le porte-greffe (JACQUEMOND et BLONDEL, 1986). Ainsi, dans certaines régions, les sélectionneurs recherchent des porte-greffe nanisant afin de réaliser des plantations à haute densité (PHILLIPS and CASTLE, 1977). En revanche, dans le Nord du Bassin méditerranéen, la sélection de porte-greffe vigoureux est encore une priorité.
- Enfin, au-delà d'un effet quantitatif sur la récolte, le porte-greffe a une influence non négligeable sur le plan qualitatif (JACQUEMOND et BLONDEL, 1986 ; BLONDEL, 1974 a). Il agit sur de nombreux facteurs importants sur le plan économique, comme le calibre, l'épaisseur de la peau, la teneur en jus ou la saveur du fruit. Ces effets sont

ENCART N° 1

L'ASPERMIE DES AGRUMES, BASES GENETIQUES ET METHODES D'AMELIORATION

L'aspermie constitue un des objectifs majeurs, des programmes d'amélioration des cultivars, destinés au marché du fruit frais. Des cultivars aspermes, issus de mutations ou d'hybridations naturelles, ont été sélectionnés dans tous les grands groupes d'agrumes cultivés. Ceci prouve que la parthénocarpié est largement diffusée dans le genre *Citrus*

L'absence de pépins repose sur trois grands types d'origine génétique :

1. L'auto-incompatibilité gamétophytique.

Elle permet d'obtenir des fruits aspermes dans les vergers monovariétaux. L'exemple le plus connu dans le Bassin méditerranéen est le clémentinier. L'incompatibilité gamétophytique est également largement répandue parmi les pamplemoussiers et se retrouve dans d'autres espèces (FROST et SOOST, 1968). De nouveaux cultivars présentant cette caractéristique peuvent être créés par hybridation entre cultivars autoincompatibles. Ce type de programme conduira toutefois à la création de variétés totalement nouvelles.

2. Les remaniements chromosomiques (Translocation, Inversion, Asynapsie).

Les remaniements chromosomiques entraînent fréquemment des stérilités gamétiques mâles ou femelles, et par voie de conséquence l'aspermie, puisque la fécondation est nécessaire au développement des embryons nucellaires (SOOST, 1987). De tels remaniements ont été observés chez de nombreux cultivars (IWAMASA *et al.*, 1988) comme, par exemple, l'oranger Valencia qui présente une translocation hétérozygote. Les irradiations ionisantes (ex. : rayon gamma) permettent d'induire ce type de mutations structurelles. LIU et DENG (1985) ont ainsi observé de nombreuses aberrations chromosomiques après irradiations de cals d'apex racinaires, tandis que RUSSO *et al.* (1982) ont réduit le nombre de pépins de la clémentine Montréal et que HEARN (1984) et WHU *et al.* (1986) ont obtenu des mutants totalement aspermes.

3. La triploïdie.

La triploïdie entraîne également la stérilité gamétique. Peu de cultivars triploïdes naturels ont été identifiés. Les plus connues sont les limes Tahiti et Bears. Des triploïdes ont été recherchés dans des descendance d'hybridation entre cultivars diploïdes et tétraploïdes. Cependant deux éléments ont considérablement limité l'efficacité de ces recherches : 1) la plupart des tétraploïdes ayant été obtenus dans des semis de cultivars polyembryonnés, ils présentent ce même caractère et sont donc difficilement utilisables comme parents femelles. 2) Les embryons triploïdes obtenus par pollinisation avec un tétraploïde sont très peu viables (WAKANA *et al.*, 1982). Il est donc apparu nécessaire de sélectionner des plantes tétraploïdes monoembryonnées. Celles-ci ont été recherchées dans des semis de cultivars monoembryonnés (ESEN et SOOST, 1977) ou par traitement à la colchicine (TACHIKAWA, 1971 ; BARRETT, 1974). Des triploïdes ont également été obtenus directement dans des descendance de croisements entre diploïdes (ESEN et SOOST, 1977). Enfin, les techniques *in vitro* ont été utilisées, pour sauver les embryons triploïdes dans des croisements diploïdes X tétraploïdes (STARRANTINO et RECUPERO, 1982) ; pour obtenir des tétraploïdes par traitement d'ovules à la colchicine (GMITTER et LING, 1991) et pour induire des triploïdes par culture d'albumen (GMITTER *et al.*, 1990). Le résultat le plus marquant de ces différents programmes est la sélection de deux hybrides pomelo x pamplemousse : Melogold et Oroblanco (SOOST et CAMERON, 1980 et 1985).

également pris en compte lors de la sélection en fonction des qualités intrinsèques des cultivars qui lui sont associés.

Pour les porte-greffe de citronnier, de cédratier ou de limettier, la compatibilité de greffage est un premier critère de sélection qui réduit considérablement le choix des génotypes.

Enfin, la polyembryonie qui est un critère essentiel, compte tenu de la multiplication par semis des porte-greffe, pourrait devenir un critère secondaire grâce au développement des techniques de micropropagation soit par microbouturage (BARLASS et SKENE, 1982 ; MOORE, 1986), soit par embryogenèse somatique (BUTTON et KOCHBA, 1977).

Les critères de sélection précoce et les pressions de sélection *in vitro*.

Les résistances ou tolérances aux maladies font partie

des premiers critères évaluables. Ainsi les résistances aux *Phytophthora* (GRIMM et HUTCHISON, 1973) et aux nématodes (O'BANNON et HUTCHISON, 1974) sont estimées sur les jeunes plants de semis. L'utilisation du test ELISA qui permet d'évaluer la concentration en virus de la Tristeza dans les tissus pourrait peut-être permettre d'évaluer la tolérance à cette maladie (GARNSEY *et al.*, 1981 ; SOOST, 1987).

Le recours aux marqueurs moléculaires a intéressé très tôt les sélectionneurs (cf. encart n° 2). Ainsi MENDEL et COHEN (1962), KESSLER (1966) ont tenté de corréler les réactions biochimiques ou physiologiques des jeunes plants à leurs comportements agronomiques. Les huiles essentielles et les polyphénols ont également été étudiés (TATUM *et al.*, 1974 ; SCORA, 1988). Toutefois, l'étude des isozymes pour la détection des plants zygotiques dans les semis d'hybridation entre espèces polyembryonnées, constitue la principale application du marquage moléculaire en création variétale (TORRES *et al.*, 1982). Le dévelop-

ENCART N° 2

APPLICATION DES TECHNIQUES DE MARQUAGE GENETIQUE AUX PROGRAMMES D'AMELIORATION DES AGRUMES

Les marqueurs moléculaires se divisent en trois grandes classes : 1) les métabolites secondaires (polyphénols, huiles essentielles, ...) analysés par chromatographie, 2) les protéines (protéines totales ou isozymes) étudiées par électrophorèse, 3) l'ADN lui-même analysé par le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP). Seules les deux dernières classes peuvent réellement être assimilées à des marqueurs génétiques, dont le polymorphisme est directement reliable à des variations génétiques. Les isozymes ont été les premiers marqueurs génétiques étudiés chez les agrumes (BUTTON *et al.*, 1976 ; TORRES *et al.*, 1978), une quinzaine de systèmes enzymatiques sont analysables en routine à partir de feuilles ou d'écorces et apportent des informations sur le polymorphisme d'une vingtaine de loci. Récemment les techniques d'analyse du RFLP ont été développées (ROOSE, 1988 ; LURO, 1989 ; RENIS *et al.*, 1990) et devraient augmenter considérablement la puissance du marquage moléculaire chez les agrumes.

Les applications du marquage génétique peuvent être subdivisées en trois grands domaines :

1. Etude des systèmes de reproduction.

Différents auteurs ont eu recours aux isozymes pour différencier les plants zygotiques et nucellaires (BUTTON *et al.*, 1976 ; TORRES *et al.*, 1978 ; SOOST *et al.*, 1980). Cette technique s'avère particulièrement efficace pour les génotypes présentant une hétérozygotie élevée (OLLITRAULT et FAURE, 1992 b) et a permis d'analyser le taux d'apomixie de différent porte-greffe (ROOSE, 1988) et de sélectionner les plants zygotiques dans des programmes d'hybridation entre espèces polyembryonnées.

L'analyse du polymorphisme enzymatique peut également être utilisée dans les programmes *in vitro* pour s'assurer de l'origine somatique des cals et embryons obtenus par culture d'ovules (OLLITRAULT *et al.*, 1992) ou vérifier le produit des programmes de fusions somatiques (BEN HAYYIM *et al.*, 1982 ; GROSSER *et al.*, 1988). Le RFLP a également été utilisé dans ce cadre (KOBAYASHI *et al.*, 1988), et est particulièrement utile pour les programmes de fusions asymétriques (VARDI *et al.*, 1987) grâce à l'utilisation de sondes cytoplasmiques.

2. Etude de l'organisation de la diversité génétique.

Le polymorphisme enzymatique et le RFLP sont performants pour l'identification des cultivars issus d'hybridations. En revanche, la discrimination de mutants d'un même génotype ancestral (ex. : orangers) est très rarement obtenue (TORRES *et al.*, 1978 ; ROOSE, 1988) ; l'utilisation de sondes mettant en évidence des séquences hautement répétées pourrait éventuellement permettre de détecter des remaniements structurels (inversions, translocations, ...). Les marqueurs génétiques ont également permis de mettre en évidence des structures intraspécifiques (hétérozygotie, diversité allélique et génotypique) très contrastées (ROOSE, 1988 ; OLLITRAULT et FAURE, 1992 a) et de confirmer la structuration du genre *Citrus* autour de trois pôles : cédratier, pamplemoussier et mandarinier (GREEN *et al.*, 1986 ; OLLITRAULT et FAURE, 1992). Ces données sont primordiales pour l'établissement des schémas d'amélioration au sein de chaque espèce.

3. Cartographie du génome.

Le RFLP permet, en théorie, de réaliser le marquage de l'ensemble du génome et donc de localiser les gènes déterminant les caractères monogéniques, ainsi que les gènes majeurs contrôlant la variance des caractères quantitatifs (PERRIER *et al.*, 1991). Les premiers pas vers la cartographie du génome d'agrumes ont été fait par TORRES *et al.* (1985) qui ont calculé les liaisons entre différents locus enzymatiques. L'université de Riverside (ROOSE, 1988), l'université de Floride et l'INRA Bordeaux (LURO *et al.*, 1991) en collaboration avec l'INRA-IRFA San Giuliano développent des programmes de cartographies du génome avec le RFLP afin de localiser les gènes de résistance aux principales maladies des agrumes. Ces programmes doivent déboucher sur la sélection précoce de ces caractères dans les programmes d'hybridation, et également, à plus long terme, sur le transfert des gènes considérés grâce au génie génétique.

pement sur agrumes des techniques RFLP, et en particulier les programmes de cartographie du génome (ROOSE, 1988 ; LURO, 1989) devraient déboucher sur la localisation et la sélection précoce des gènes majeurs de certains caractères d'intérêt agronomique.

Certains auteurs ont utilisé les techniques *in vitro* pour réaliser une sélection ou une évaluation précoce. Des clones ont ainsi été isolés à partir de cultures de cals sur des milieux à teneur élevée en sel (KOCHBA *et al.*, 1982). Les plantes régénérées à partir d'un de ces cals semblent présenter au champ une résistance au sel plus importante (SPIE-

GEL-ROY et BEN HAYYIM, 1985). NACHMIAS *et al.*, (1977) ont démontré que la croissance des cals nucellaires du citronnier Eureka (sensible au mal secco) était bloquée par l'addition dans le milieu de la toxine du mal secco, tandis que les cals de l'oranger Shamouti (résistant) n'étaient pas affectés. JONARD *et al.*, (1988) proposent d'évaluer la compatibilité de greffage grâce à des microgreffes d'apex et des cocultures de cals *in vitro*.

L'évaluation des autres caractères demande beaucoup plus de temps. Ainsi, deux à trois années de récolte permettent de juger la précocité, le calibre et la qualité des

fruits, tandis que 10 à 15 ans sont nécessaires pour évaluer la valeur agronomique des porte-greffe (WUTSCHER, 1979).

LES METHODES D'AMELIORATION

Un enrichissement des populations de porte-greffe, en gènes de résistance, par des schémas récurrents à long terme, est théoriquement envisageable. En revanche, la situation est plus complexe pour ce qui concerne les cultivars. Les caractéristiques de certaines «espèces» d'agrumes comme les orangers, les bigaradiers, les pomelos ou les citronniers reposent sur des structures polygéniques complexes, à l'hétérozygotie relativement élevée (OLLITRAULT, 1990 a). Ces structures ont été diversifiées par des mutations somatiques fixées par la multiplication végétative. Une amélioration au sein de chacune de ces «espèces» n'est donc pas réalisable par des travaux d'hybridation, si l'on veut conserver les caractéristiques spécifiques qui sont importantes, particulièrement pour le marché du fruit frais. Le recours à l'hybridation intraspécifique est, en revanche, envisageable au sein du groupe des mandariniers ou des pamplemoussiers. Les hybridations interspécifiques pourraient également s'avérer intéressantes pour le marché de la transformation pour lequel les critères pomologiques ont peu d'importance.

En pratique, les contraintes du régime de reproduction, la longueur de la phase juvénile, l'encombrement des descendance et l'absence de critère de sélection précoce pour la plupart des caractères (en particulier pour l'évaluation de la valeur agronomique) ont été autant de facteurs limitants à l'établissement de schémas de sélection sur plusieurs générations. C'est pourquoi, tirant parti de la multiplication végétative, les améliorateurs se sont la plupart du temps cantonnés à une sélection clonale. Ils ont ainsi porté l'essentiel de leurs efforts sur les techniques de recherche ou d'induction de polymorphisme sur un cycle.

La sélection porte ainsi, soit sur des mutations ou chimères spontanées identifiées en verger, soit sur des génotypes obtenus par hybridation, par mutagenèse induite ou par recours aux biotechnologies.

Les mutants et chimères.

• Mutations spontanées.

Les mutants et chimères spontanés ont constitué, et constituent encore, un matériel de choix pour la sélection clonale. L'efficacité d'une telle sélection repose sur un suivi arbre par arbre de la part des agrumiculteurs et une inter-pénétration étroite entre la profession et la recherche. Elle a fourni pour la clémentine, en Espagne (BONO *et al.*, 1982), au Maroc et en Corse, de bons résultats pour l'étalement de la précocité, l'amélioration des calibres ou de la coloration des fruits. Des résultats équivalents ont été obtenus pour la mandarine Satsuma au Japon (IWAMASA et NISHIURA, 1982). C'est également ce type de sélection qui est, sur une échelle de temps beaucoup plus longue, à l'origine de la diversification des orangers, des citronniers ou des pomelos.

Les mutations de bourgeons peuvent conduire à la formation de chimères. Certains pomelos rouges ou roses (OLSON *et al.*, 1966), l'orange Shamouti (SPIEGEL-ROY, 1979) et certaines oranges sans acidité (CAMERON et SOOST, 1979) se sont ainsi révélés être des chimères péri-clines. Par ailleurs, certaines chimères panachées présentent de l'intérêt pour le marché de l'ornement.

• La mutagenèse induite.

De nombreuses expériences de mutagenèse induite par irradiation ont été réalisées depuis 1935 pour l'amélioration des cultivars.

Les premiers travaux d'irradiation ont porté sur des greffons ou des graines, mais plus récemment certains auteurs ont cherché à limiter la formation de chimères, soit par l'irradiation de boutons floraux (IKEDA, 1976), soit par l'irradiation de cals nucellaires (MITRA et CHATURVEDI, 1972 ; KOCHBA et SPIEGEL-ROY, 1976), de suspensions cellulaires ou de protoplastes (VARDI *et al.*, 1975).

Les taux d'irradiation efficace varient de manière importante suivant l'organe traité. Ils s'échelonnent entre 20 grays pour des boutons floraux (IKEDA, 1976), 30 à 60 grays pour des greffons (KERKADZE et KUTATELADZE, 1979 ; RUSSO *et al.*, 1982 ; LEGAVE *et al.*, 1989), et enfin, 120 à 160 grays pour des cals nucellaires qui s'avèrent peu radiosensibles (KOCHBA et SPIEGEL-ROY, 1976 ; OLLITRAULT, 1992).

La mutagenèse induite s'avère être un bon outil pour la recherche de cultivars aspermes (cf. encart n° 1). De tels mutants ont ainsi été obtenus par HEARN (1984) et WHU *et al.* (1986).

Quelques mutants de coloration ont également été obtenus : le pomelo rouge et asperme Star Ruby, est issu d'un programme d'irradiation (HENSZ 1960). Notons enfin les travaux de KERKADZE et KUTATELADZE (1979) qui ont sélectionné des mutants de précocité et de nanisme du cultivar de mandarine Satsuma «Kuвано wase».

La recombinaison sexuée.

La compatibilité sexuelle dans le genre *Citrus*, ainsi qu'avec les genres apparentés est très large (De ROCCA SERRA et OLLITRAULT, 1991). Toutefois le caractère polyembryonné de très nombreux génotypes a longtemps limité certains types d'hybridation et privilégié l'utilisation de parents femelles monoembryonnés. Le recouvrement des embryons zygotiques dans les croisements entre variétés polyembryonnées peut être amélioré grâce à des traitements chimiques (DE LANGE et VINCENT, 1977) et la culture d'embryons immatures (RANGAN *et al.*, 1969). L'étude du polymorphisme enzymatique permet également de repérer les plants hybrides dans les semis.

Les premiers programmes importants de création variétale par hybridation ont été entrepris par l'USDA en Floride à partir de 1893. Leurs objectifs étaient la recherche de résistances aux maladies et au froid. Le recours à *Poncirus trifoliata* comme source de résistance au froid ne permit

pas d'obtenir de cultivars comestibles, car il induisait dans les hybrides des teneurs en huiles essentielles très élevées. Certains hybrides *Poncirus x Citrus* s'avèrent, en revanche, de très bons porte-greffe comme, par exemple, certains citrumelos (*Poncirus x pomelo*) et surtout les citranges Troyer et Carrizo (*Poncirus x orange*).

Des cultivars intéressants ont été sélectionnés parmi des hybrides entre pomelo et mandarinier (tangelo Nova, Orlando et Minneola). En URSS un hybride Satsuma x pomelo présentant une bonne résistance au froid a été sélectionné (KARAYA, 1981). Quelques hybrides entre mandariniers se sont également révélés intéressants (Fairchild, Frémont, Fortune, Wilking, Honey ...). Le clémentinier serait un hybride entre mandarinier commun et bigaradier granito ; cependant l'étude des isozymes suggère plutôt une hybridation entre mandarinier commun et oranger (OLLITRAULT et FAURE, 1992 a).

Les hybridations entre genres éloignés (*Microcitrus*, *Citropsis*, *Fortunella*, *Murraya*) réalisées plus récemment (BARRETT, 1977 ; IWAMASA et al., 1988) n'ont pas encore débouché sur la sélection de cultivars performants.

Ces différents travaux d'hybridation ont mis en évidence une dépression de consanguinité très importante dans les descendances d'autofécondation des cultivars polyembryonnés, tandis que celle-ci semble moins marquée pour les monoembryonnés (SOOST et CAMERON, 1975). Ces résultats peuvent s'expliquer par une accumulation de mutations défavorables à l'état hétérozygote conservées par la multiplication somatique, alors qu'elles sont contre-sélectionnées dans les populations à reproduction sexuée. Ceci limite encore davantage la probabilité d'obtenir des cultivars intéressants par des hybridations intraspécifiques d'orangers, de citronniers, de bigaradiers ou de pomelos. Pour l'essentiel du génome, ces croisements s'apparentent, en effet, à des autofécondations.

A l'inverse, les hybridations interspécifiques et intergénériques (*Poncirus x Citrus*) présentent généralement un hétérosis important (SOOST et CAMERON, 1975).

La polyploïdie.

Le principal objectif des travaux sur la polyploïdie a été l'obtention de cultivars triploïdes aspermes. Plusieurs voies ont été explorées pour y parvenir (cf. encart n° 1) :

- 1) recherche de triploïdes spontanés dans des semis d'hybridation entre diploïdes (ESEN et SOOST, 1977 ; OIYAMA et OKUDAI, 1983) ;
- 2) hybridations entre diploïdes et tétraploïdes (RUSSO et TORRISI, 1953 ; TACHIKAWA et al., 1961 ; ESEN et SOOST, 1977 ...) ;
- 3) cultures d'albumen *in vitro* (GMITTER et al., 1990).

Peu de cultivars commerciaux triploïdes sont issus de ces différents programmes. Les principaux sont deux hybrides pamplemousse x pomelo : Melogold et Oroblanco (SOOST et CAMERON, 1980, 1985). Une orange triploïde

présentant des caractères favorables aurait également été obtenue par MAISURADZE et al. (1978).

Mis à part leur utilisation comme géniteur, pour l'obtention de triploïdes, les cultivars tétraploïdes présentent peu d'intérêt pour une utilisation en production. Leurs rendements sont, en effet, généralement faibles et le fruit est peu attractif avec une écorce épaisse. La vigueur moindre des tétraploïdes pourrait en revanche s'avérer intéressante pour les porte-greffe, dans le cadre de plantation à haute densité.

Les travaux sur l'haploïdie ont été peu nombreux. Ils pourraient toutefois connaître un regain d'intérêt, dans le cadre des programmes de cartographie du génome, afin d'obtenir des familles d'haploïdes doublés. L'obtention de plantes ou cals haploïdes apparaît peu aisée. Elle a été menée à bien par cultures d'anthers de *Poncirus trifoliata* (HIDAKA et al., 1979), de Calamondin (CHEN et al., 1980), d'oranger Trovita (HIDAKA et KAJIURA, 1989) et de différents cultivars de citronniers (GERMANA et al., 1990). Les haploïdes ou haploïdes doublés obtenus sont très peu vigoureux ; de même que pour la dépression de consanguinité, ceci pourrait s'expliquer par une accumulation de mutations défavorables à l'état hétérozygote chez les génotypes parentaux.

Les fusions somatiques et le génie génétique.

La forte aptitude à l'embryogenèse des cals nucellaires d'agrumes (cf. encart n° 3) a été rapidement exploitée pour isoler et régénérer des protoplastes. L'oranger est ainsi la première espèce d'angiosperme ligneuse pour laquelle une méthode de régénération de plantes viables à partir de protoplastes a été établie (VARDI et al., 1975). Cette technique a été étendue aux autres espèces du genre *Citrus* (VARDI et SPIEGEL-ROY, 1982) ainsi qu'au genre *Microcitrus* (VARDI et al., 1986). OHGAWARA et al. (1985) ont obtenu le premier hybride somatique intergénérique entre *Poncirus* et oranger. Depuis, de nombreux hybrides somatiques ont été réalisés par diverses équipes (KOBAYASHI et al., 1988 ; GROSSER, 1990). Ces différents travaux visent essentiellement la création de porte-greffe cumulant les caractères de résistance des parents. Ils élargissent considérablement les ressources génétiques accessibles aux sélectionneurs puisqu'ils autorisent des hybridations entre parents sexuellement incompatibles. Plus de 1 400 hybrides somatiques représentant 12 combinaisons sont en cours d'évaluation agronomique en Floride (GROSSER, 1990). Des fusions asymétriques (VARDI et al., 1987) ont également été réalisées entre *Poncirus* et *Citrus* ainsi qu'entre *Citrus* et *Microcitrus* (VARDI et al., 1989) afin d'analyser les interactions nucléo-cytoplasmiques.

L'exploitation la plus récente des cals nucellaires et protoplastes d'agrumes est la transformation génétique. Ainsi KOBAYASHI et UCHIMIYA (1989) ont réussi le transfert d'un gène de résistance à la kanamycine dans un protoplasme d'oranger mais n'ont toutefois pas régénéré de plantes. HIDAKA et al. (1990) ont transféré des gènes de résistance à la kanamycine et à l'hygromycine grâce à des cocultures de cals nucellaires avec *Agrobacterium tumefaciens* ; les plantes régénérées présentaient les mêmes résistances.

ENCART N° 3

L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE *IN VITRO* DES AGRUMES :
un élément clé des nouveaux programmes d'amélioration

L'embryogenèse somatique est maîtrisée, pour les espèces polyembryonnées du genre *Citrus*, depuis le début des années 1970. La culture *in vitro* d'ovules, fécondés ou non, permet d'amplifier le phénomène naturel d'apomixie ; soit directement (BUTTON et BORNMAN, 1971 ; MITRA et CHATURVEDI, 1972) soit après passage par cal (KOCHBA et SPIEGEL-ROY, 1977 a). Il semble ainsi y avoir un lien direct entre le degré de polyembryonie *in vivo* d'un génotype et ses capacités embryogènes *in vitro* (MOORE, 1985). De rares proliférations d'embryons originaires des tissus zygotiques de l'ovule ont été mises en évidence grâce à des études de polymorphisme isoenzymatique (OLLITRAULT *et al.*, 1992). Dans la majorité des cas, les embryons ou les cals friables (à forte aptitude embryogène) sont d'origine nucellaire (KOBAYASHI *et al.*, 1981). Pour les espèces monoembryonnées, les exemples d'embryogenèse somatique sont plus rares et les plantes régénérées présentent fréquemment des caractères aberrants (NAVARRO *et al.*, 1985).

La nature des sucres (HIDAKA et OMURA, 1989) ou des hormones (KOCHBA et SPIEGEL-ROY, 1977 b), ajoutés aux milieux, permet d'orienter les cultures de cals nucléaires soit vers la multiplication de ces cals, soit vers la prolifération d'embryons. Pour les cultivars polyembryonnés, aucune variation somaclonale n'a été observée sur les plants régénérés, et ce même après plusieurs années de repiquage des cals (STARRANTINO and RUSSO, 1983 ; KOBAYASHI, 1987).

Les cals nucléaires constituent ainsi le coeur des programmes faisant appel à l'embryogenèse somatique (fig. 1) :

- pressions de sélection sur des cals ayant subi des traitements mutagènes : sel (KOCHBA *et al.*, 1982), herbicide, toxine du mal secco (NACHMIAS *et al.*, 1977) ...
- transfert de gène par coculture de cals nucléaires et d'*Agrobacterium* (HIDAKA *et al.*, 1990),
- isolement de protoplastes à forte capacité embryogène ouvrant la voie à de nombreux travaux de fusion somatique (GMITTER, 1990) ainsi qu'à des transferts de gènes par électroporation (KOBAYASHI et UCHIMIYA, 1989),
- cryoconservation du germplasm (SAKAI *et al.*, in press),
- multiplication des porte-greffe (BUTTON et KOCHBA, 1977).

Dans le cadre des programmes de création de cultivar, la technique de greffage d'embryons (OLLITRAULT, 1990 b) pourrait permettre d'accélérer les travaux de sélection, grâce à un gain de temps important par rapport à la voie classique (allongement *in vitro* des embryons et acclimatation), et à un raccourcissement de la phase juvénile.

CONCLUSION

Les particularités du régime de reproduction des agrumes ont limité considérablement les progrès génétiques, ce malgré de nombreux travaux et la très grande diversité génétique offerte aux sélectionneurs. Les avancées les plus spectaculaires ont été obtenues pour les porte-greffe grâce aux hybridations intergénériques *Poncirus x Citrus*. Le développement des biotechnologies permet toutefois d'être plus optimiste pour les travaux à venir. Le marquage molé-

culaire a, en effet, permis d'éclaircir l'organisation génétique des agrumes, de distinguer les embryons somatiques et zygotiques, et pourrait, dans un proche avenir, autoriser la sélection précoce de certains caractères d'intérêt agronomique, dans les descendance de croisements. Les techniques *in vitro* et en particulier celles liées à l'embryogenèse somatique sont également très prometteuses, soit en soutien aux schémas de sélections classiques (sauvetage d'embryons, mutagenèse, multiplication d'un génotype à tester ...), soit par l'introduction de nouvelles approches comme la fusion somatique ou le transfert de gènes.

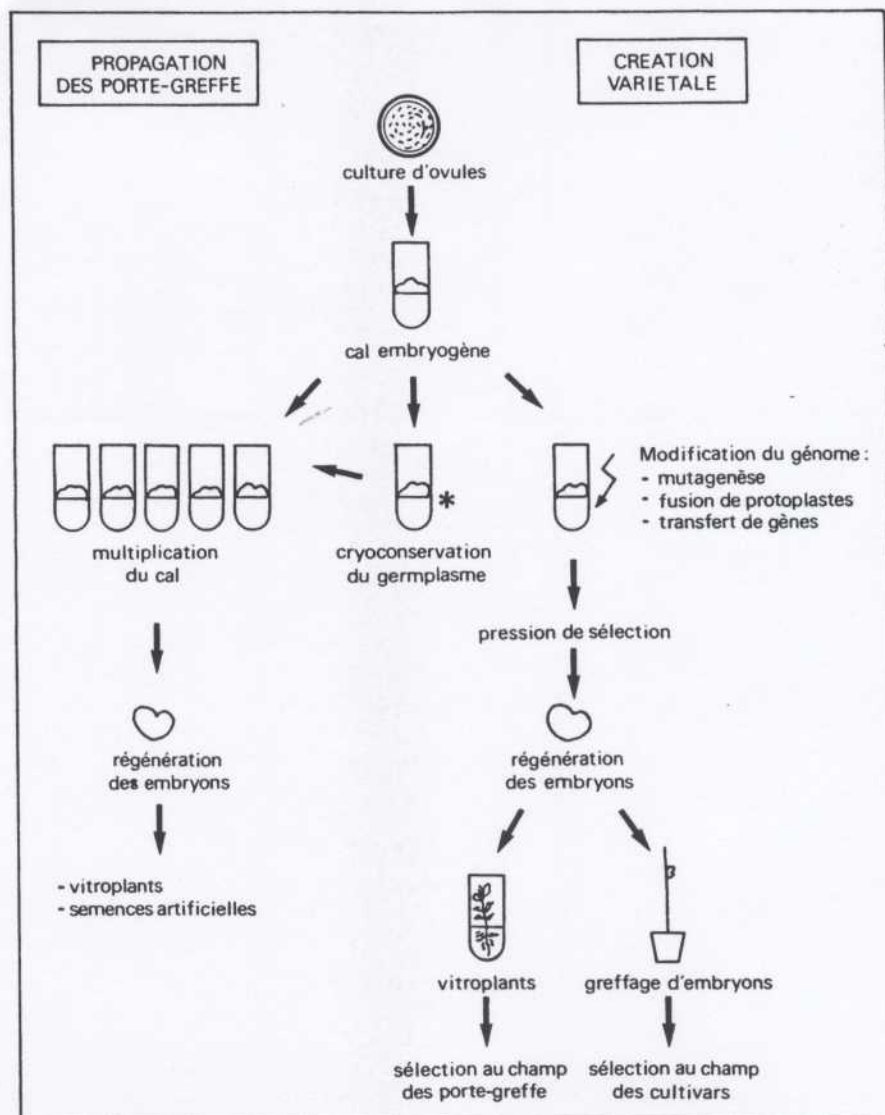


FIGURE 1 - Embryogenèse somatique et amélioration des agrumes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AUBERT (B.). 1989. Preventing *Citrus* debilitating diseases for profitable crops in South East Asia. *UNDP FAO Doc.*, 18 p.

BARLASS (M.) and SKENE (K.G.M.). 1982. *In vitro* plantlet formation from *Citrus* species and hybrids. *Sci. Hort.*, 17, 333-342.

BARRETT (H.C.). 1974. Colchicine-induced poliploidy in *Citrus*. *Bot. Gaz.*, 135, 29-34.

BARRETT (H.C.). 1977. Intergeneric hybridization of *Citrus* and other genera in *Citrus* improvement. 1977 *Proc. Int. Soc. Citric.*, 2, 586-589.

BARRETT (H.C.). 1982. Breeding cold hardy citrus scion varieties. *Proc. Int. Soc. Citric.*, 1, 61-68.

BEN HAYYIM (G.), SHANI (A.) and VARDI (A.). 1982. Evaluation of isozyme system in *Citrus* to facilitate identification of fusion product. *Theor. Appl. Genet.*, 64, 1-5.

BLONDEL (L.). 1974 a. Résistance au froid conférée au *Citrus* par certains porte-greffe. *Fruits*, 29 (3), 209-213.

BLONDEL (L.). 1974 b. Influence des porte-greffe sur la qualité des fruits de *Citrus*. *Fruits*, 29 (4), 285-290.

BONO (R.), FERNANDEZ DE CORDOVA (L.) and SOLER (J.). 1982. Arrufatina, Esbal and Guillermina, three Clementine mandarin mutation recently appearing in Spain. *Proc. Int. Soc. Citric.*, 1, 94-96.

BUTTON (J.) and BORNMAN (C.H.). 1971. Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange *in vitro*. *J.S. Afric. Bot.*, 37, 127-134.

BUTTON (J.), VARDI (A.) and SPIEGEL-ROY (P.). 1976. Root peroxylase isozymes as an aid in *Citrus* breeding and taxonomy. *Theor. appl. genet.*, 47, 119-123.

- BUTTON (J.) and KOCHBA (J.). 1977.
Tissue culture in the citrus industry.
in : J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds). *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 70-92.
- CAMERON (J.W.) and SOOST (R.K.). 1979.
Absence of acidless progeny from crosses of acidless x acidless *Citrus* cultivars.
J. Am. Soc. hort. Sci., 104, 220-222.
- CHEN (Z.Q.), WANG (M.Q.) and HUIHUA (L.). 1980.
The induction of *Citrus* pollen plants in artificial media.
Acta Genet. Sin., 7, 189-191.
- DE LANGE (J.H.) and VINCENT (A.P.). 1977.
Citrus breeding : new techniques in stimulation of hybrid production and identification of zygotic embryos and seedlings.
Proc. Int. Soc. Citric., 2, 589-595.
- DE ROCCA SERRA Dominique et OLLITRAULT (P.). 1991.
L'amélioration des agrumes.
1.- Les ressources génétiques.
CIRAD-IRFA, R.A. Agrumes.
- ESEN (A.) and SOOST (R.K.). 1977.
Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo : endosperm ploidy ratio in *Citrus*.
in : «I. Congreso mundial de Citricultura, 1973» (O. Carpena, ed) Murcia, Valencia, vol. II, 53-63.
- FAO. 1990.
Agrumes frais et transformés, statistiques annuelles.
- FROST (H.B.) and SOOST (R.K.). 1968.
Seed reproduction : development of gametes and embryos.
in : «The Citrus industry» (W. Reuther, L.D. Batchelor and H.J. Webber, eds), University of California Press, vol. II, 290-324.
- GARNSEY (S.), BARRETT (H.) and HUTCHISON (D.). 1981.
Resistance to *Citrus* tristeza virus in *Citrus* hybrids as determined by ELISA.
Phytopathology, 71, 875.
- GERMANA (M.A.), CRESCIMANNO (F.G.) and DE PASQUALE (F.). 1990.
Androgenesis in 5 cultivars of *Citrus lemon* L. Burm F.
XXIII Int. Hort. Congress, Firenze, Italia.
- GMITTER (F.G.), LING (X.B.) and DENG (X.X.). 1990.
Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli *in vitro*.
Theor. Appl. Genet., 80, 785-790.
- GMITTER (F.G.) and LING (X.). 1991.
Embryogenesis *in vitro* and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped *Citrus* ovules treated with colchicine.
J. Amer. Soc. Hort. Sci., 116 (2), 317-321.
- GREEN (R.M.), VARDI (A.) and GALUN (E.). 1986.
The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species, and comparison with related genera.
T.A.G., 72, 761-769.
- GRIMM (G.R.) and HUTCHISON (D.H.). 1973.
A procedure for evaluating resistance of *Citrus* seedling to *Phytophthora parasitica*.
Plant Dis. Rptr., 57, 669-672.
- GROSSER (J.W.). 1990.
Citrus Rootstock Improvement by Cell Fusion.
Citrus and Vegetable Magazine, 9, 28-32.
- GROSSER (J.W.), GMITTER (F.G.) and CHANDLER (J.L.). 1988.
Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv Flying dragon.
Plant Cell Reports, 7, 5-8.
- HEARN (C.J.). 1984.
Development of seedless orange, *Citrus sinensis*, cultivar Pineapple and grapefruit, *Citrus paradisi*, cultivars through seed irradiation.
J. Amer. Soc. Hort. Sci., 109, 270-273.
- HENSZ (R.A.). 1960.
Effect of X ray and thermal neutrons on *Citrus* propagating material.
J. Rio Grande Val. Hort. Soc., 14, 21-25.
- HIDAKA (T.), YAMADA (Y.) and SHICHIJO (T.). 1979.
In vitro differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.
Japan J. Breed., 29 (3), 248-254.
- HIDAKA (T.) and KAJIURA (I.). 1989.
A simple method for acclimatization of *in vitro* plantlets of *Citrus*.
Bull. Fruit Tree Res. Stn. B., 16, 19-28.
- HIDAKA (T.) and OMURA (M.). 1989.
Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture.
Bull. Fruit Tree Res. Stn. B., 16, 1-17.
- HIDAKA (T.), OMURA (M.), UGARI (M.), TOMIYAMA (M.), KATO (A.), OHSHIMA (M.) and MOTOYOSHI (F.). 1990.
Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp. from suspension cells.
Japan J. Breed., 40, 199-207.
- IDEDA (I.), KOBAYASHI (S.) and NAKATANI (N.). 1980.
Differences in cold resistance of various citrus varieties and hybrid seedlings based on the data obtained from the frosts of 1977.
Bull. Fruit Tree Res. Stn., Ser. E, Akitsu JPN N° E, 49-65. (Japanese with english summary).
- IKEDA (F.). 1976.
Induced bud sports in *Citrus sunki* from nucellar seedlings.
In improvement of vegetatively propagated plant and tree crops through induced mutation, Wageningen IAEA, Vienna, 95-96.
- IWAMASA (M.) and NISHIURA (M.). 1982.
Recent citrus mutant selections in Japan.
1981. Proc. Int. Soc. Citric., 1, 96-99.
- IWAMASA (M.), NITO (N.) and LING (J.T.). 1988.
Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily, Aurantioideae.
in : *Proc. 6st int. Citr. Cong. Goren and Mendel eds.*, Philadelphia, 123-130.
- JACQUEMOND (C.) et BLONDEL (L.). 1986.
Contribution à l'étude des porte-greffe des agrumes : le *Poncirus trifoliata*.
2.- Etude du comportement des *Poncirus trifoliata* après greffage.
Fruits, 41 (7-8), 449-464.
- JONARD (R.), LUCKMAN (D.), SCHALL (Françoise) et VILLEMUR (P.). 1988.
Essai de contrôle précoce des incompatibilités au greffage chez des espèces fruitières : abricotier et citronnier, à l'aide de plusieurs techniques de culture *in vitro* : microgreffage, associations d'entre-nœuds, fusions de cals, suspensions cellulaires.
8e Colloque sur les Recherches fruitières, Bordeaux, 7 et 8 décembre 1988.
- KARAYA (R.K.). 1981.
Results of introducing and breeding grapefruit and pomelo.
Subtrop. Kul't, n° 2, 24-28 (in Russian).
- KERKADZE (I.G.) and KUTATELADZE (D. Sh.). 1979.
Radiation mutants of *Citrus* and their breeding value.
Subtrop. Kul't, n° 3, 65-66 (in Russian).
- KESSLER (B.). 1966.
The physiological basis of the tolerance of horticultural crops to cold, drought and water stresses.
An. Rept. Project A 10-CR-142. The Volcani Institute of Agricultural Research, Rehovot, Israel.
- KOBAYASHI (S.). 1987.
Uniformity of plants regenerated from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts.
Theor. Appl. Genet., 74, 10-14.
- KOBAYASHI (S.), IEDA (I.) and NAKATANI (M.). 1981.
Role of the primordium cell in nucellar embryogenesis in *Citrus*.
in : *Proc. Int. Soc. Soc. Citric.*, vol. 1, 44-48.
- KOBAYASHI (S.), OHGAWARA (T.), OIYAMA (I.) and ISHII (S.). 1988.
Somatic hybridization between Navel orange and Murcott tangor.
International Citrus Congress, Middle East.
- KOBAYASHI (S.) and UCHIMIYA (H.). 1989.
Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer.
Jpn. J. Genet., 64, 91-97.
- KOCHBA (J.) and SPIEGEL-ROY (P.). 1976.
The use of *Citrus* tissue culture for mutation breeding : effects of plant growth substances and gamma irradiation on embryogenesis.
In improvement of vegetatively propagated plant and tree crops through induced mutation, Wageningen, IAEA, Vienna, 83-92.
- KOCHBA (J.) and SPIEGEL-ROY (P.). 1977 a.
Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of *Citrus*.
Hort-Science, 12 (2), 110-114.
- KOCHBA (J.) and SPIEGEL-ROY (P.). 1977 b.
The effect of auxins, cytokinins and inhibitors of embryogenesis in habituated ovular callus of the «Shamouti» orange (*Citrus sinensis*).
Z. Pflanzen-physiol., 81, 283-288.

- KOCHBA (J.), BEN HAYYIM (G.), SPIEGEL-ROY (P.), SAAD (S.) and NEUMANN (H.). 1982.
Selection of stable salt-tolerant callus cell lines and embryos in *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium*
Z. Pflanzen-physiol., 106, 111-118.
- LEGAVE (J.M.), TISNE-AGISTINI (Dominique) et JACQUEMOND (C.). 1989.
Effets physiologiques induits par irradiation gamma aiguë de rameaux greffons de clémentinier.
Fruits, 44 (6), 329-333.
- LIU (G.B.) and DENG (S.S.). 1985.
Induced mutation in citrus shoot tip culture *in vitro*.
Fruit Var. J., 39 (2), 38-43.
- LURO (F.). 1989.
Obtention de fragments d'ADN génomique révélant un polymorphisme de la taille des fragments de restriction (RFLP) chez les agrumes.
DEA Biologie-Santé, Université de Bordeaux II.
- LURO (F.), LAIGRET (F.) et OLLITRAULT (P.). 1991.
Cartographie du génome d'agrumes.
CIRAD-IRFA, R.A. Agrumes.
- MAISURADZE (N.I.), KUKULADZE (E.K.) and GURTSAKAYA (V.G.). 1978.
Intraspecific triploid hybrid of sweet orange.
Subtrop. Kul't n° 5, 60-63 (in Russian).
- MENDEL (K.) and COHEN (A.). 1962.
Methods for the rapid evaluation of rootstocks for citrus.
The Volcani Institute of Agricultural Research, Rehovot, Israel, Spec. Bull. 46.
- MITRA (G.C.) and CHATURVEDI (H.C.). 1972.
Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vivo*-grown emasculated flower buds of *Citrus* sp.
Bull. Torrey Bot. Club., 99, 184-189.
- MOORE (G.A.). 1985.
Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature *Citrus* fruit.
J. Amer. Soc. Hort. Sci., 110 (1), 66-70.
- MOORE (G.A.). 1986.
In vitro propagation of citrus rootstocks.
Hortscience, 21 (2), 300-301.
- NACHMIAS (A.I.), BARASH (I.), SOLEL (Z.) and SROBEL (G.A.). 1977.
Translocation of mal secco toxin in lemon and its effects on electrolyte leakage, transpiration and citrus callus growth.
Phytoparasitica, 5, 94-103.
- NAVARRO (L.), ORTIZ (J.M.) and JUAREZ (J.). 1985.
Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured *in vitro*.
Hort-Science, 20 (2), 214-215.
- O'BANNON (J.H.) and HUTCHISON (D.J.). 1974.
Development and selection of rootstocks resistant to the Citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans*.
in : *Proc. first intern. Citrus short course. Univ. of Fla., Gainesville*, 22-29.
- OHGAWARA (T.), KOBAYASHI (S.), OHGAWARA (E.), UCHIMIYA (H.) et ISHII (S.). 1985.
Somatic hybrids plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*.
Theor. Appl. Genet., 71, 1-4.
- OIYAMA (I.) and OKUDAI (N.). 1983.
Studies on the polyploidy breeding in *Citrus*.
3. Occurrence of triploids in the progenies of diploid sweet oranges, *Citrus sinensis*, crossed with diploids.
Bull. Fruit Tree Res. Sta., Ser. D n° 5, 1-8 (in Japanese, with English summary).
- OLLITRAULT (P.). 1990 a.
Isozymes and RFLP's as genetic markers in citrus selection.
in : *Proc. 4th Int. Asia-Pacific Conf. on Citrus Rehabilitation. FAO-UNDP RAS/86/022 reg. proj.*, 57-68.
- OLLITRAULT (P.). 1990 b.
Somatic embryo grafting : a promising technique for citrus breeding and propagation.
in : *Proc. ISCN, 3rd Congress, Australia*, 10 p.
- OLLITRAULT (P.). 1992.
Research of seedless Willow leaf mandarin by gamma ray irradiation.
VII International Citrus Congress, Acireale (Italy), March 8-13.
- OLLITRAULT (P.) et FAURE (X.). 1992 a.
Système de reproduction et organisation de la diversité génétique dans le genre *Citrus*.
Colloque International « Complexe d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes ». Paris (France), 8-10 Janvier.
- OLLITRAULT (P.) et FAURE (X.). 1992 b.
Citrus rootstocks characterization with bark and leaf isozyme ; application to screen zygotic and nucellar trees.
VII International Citrus Congress, Acireale (Italy), March 8-13.
- OLLITRAULT (P.), OLLITRAULT (Frédérique) et CABASSON (Cécile). 1992.
Induction de cals embryogènes d'agrumes par culture d'ovules. Détermination isoenzymatique de l'origine tissulaire des embryons.
Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p.204-212.
- OLSON (E.O.), CAMERON (J.W.) and SOOST (R.K.). 1966.
The Burgundy sport : Further evidence of the chimeral nature of pigmented grapefruits.
Hortscience, 1, 57-59.
- PERRIER (X.), DUBOIS (Cécile) et OLLITRAULT (P.). 1992.
Cartographie du génome et QTL's.
L'approche biométrique et les contraintes biologiques.
Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p.135-144.
- PHILLIPS (R.L.) and CASTLE (W.S.). 1977.
Evaluation of twelve rootstocks for dwarfing.
J. Amer. Soc. Hort. Sci., 102, 526-528.
- RENIS (M.), CIRVILLERI (G.), ALBANESE (G.) and REFORGIATO (G.). 1990.
RFLP analysis of citrus nuclear and mitochondrial genome.
XXIII Int. Hort. Congress, Firenze, Italie.
- RANGAN (T.S.), MURASHIGE (T.) and BITTERS (W.P.). 1969.
In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus.
in : *Chapman (ed.) Proc. 1st. Int. Citrus Symp. Riverside, Univ. California*, vol. 1, 225-229.
- ROOSE (M.L.). 1988.
Isozymes and DNA Restriction Fragment length Polymorphism in *Citrus* Breeding and Systematics.
Proc. 6th Int. Citr. Cong., 155-165.
- RUSSO (F.) and TORRISI (M.). 1953.
Problems and objectives of Citrus genetics.
1. Selection of hybrids, nucellar embryos, and triploids and the artificial production of mutations.
Ann. Sper. Agric., Rome 7, 883-906 (in Italian).
- RUSSO (F.), DONINI (B.) and STARANTINO (A.). 1982.
Mutagenesis applied for Citrus improvement.
1981 Proc. Int. Soc. Citric., 1, 91-94.
- SAKAI (A.), KOBAYASHI (S.) and OIYAMA (I.).
Freeze preservation of nucellar callus of Navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by a simple and novel method.
Plant Cell Reports, in press.
- SCORA (R.W.). 1988.
Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated *Citrus*.
Margraf Scientific Books, 277-289.
- SOOST (R.K.). 1987.
Breeding Citrus - Genetics and Nucellar Embryogeny.
in : *«Improving Vegetatively Propagated crops» (A. Abott and R. Atkin eds), Academic Press London*, 83-110.
- SOOST (R.K.) and CAMERON (J.W.). 1975.
Citrus.
in : *«Advances in fruit breeding» (J. Janick and J.N. Moore, eds), Purdue University Press, West Lafayette, Indiana*, 507-540.
- SOOST (R.K.), WILLIAMS (T.E.) and TORRES (A.M.). 1980.
Identification of nucellar and zygotic seedlings with leaf isozymes.
Hortscience, 15, 728-729.
- SOOST (R.K.) and CAMERON (J.W.). 1980.
'Oroblanco' a triploid pummelo-grapefruit hybrid.
HortScience, 15, 667-669.
- SOOST (R.K.) and CAMERON (J.W.). 1985.
'Melogold' a triploid pummelo-grapefruit hybrid.
Hortscience, 20, 1134-1135.
- SPIEGEL-ROY (P.). 1979.
On the chimeral nature of the Shamouti orange.
Euphytica, 28, 361-365.

- SPIEGEL-ROY (P.) and BEN HAYYIM (G.). 1985.
Selection and breeding for salt tolerance *in vitro*.
Plant Soil, 89, 243-252.
- STARRANTINO (A.) and RECUPERO (G.). 1982.
Citrus hybrids obtained *in vitro* from 2X females by 4X males.
Proc. Int. Soc. Citric., 1, 31-32.
- STARRANTINO (A.) and RUSSO (F.). 1983.
Reproduction of seedless orange cultivars from undeveloped ovules raised *in vitro*.
Acta horticulturae, 131, 253-258.
- TACHIKAWA (T.). 1971.
Investigations on the breeding of Citrus trees.
IV.- On the chromosome numbers in Citrus.
Bull. Shizuoka Pref. Citrus. Exp. Stn., 9, 11-25 (in Japanese, English summary).
- TACHIKAWA (T.), TANAKA (Y.) and HARA (S.). 1961.
Investigation on the breeding of citrus trees.
I. Study on the breeding of triploid Citrus varieties.
Bull. Shizuoka Pref. Citrus Exp. Stn., 4, 33-44 (in Japanese, English summary).
- TATUM (J.H.), BERRY (R.E.) and HEARN (C.I.). 1974.
Characterization of Citrus cultivars and separation of nucellar and zygotic seedlings by thin layer chromatography.
Proc. Fla. State Hort. Soc., 87, 75-81.
- TORRES (A.M.), SOOST (R.K.) and DIEDENHOFEN (U.). 1978.
Leaf isozymes as genetic markers in Citrus.
Amer. J. Bot., 65 (8), 869-881.
- TORRES (A.M.), SOOST (R.K.) and MAU-LASTOVICKA (T.). 1982.
Citrus isozymes : genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings.
Journ. Heredity, 73, 335-339.
- TORRES (A.M.), MAU-LASTOVICKA (T.), WILLIAMS (T.E.) and SOOST (R.K.). 1985.
Segregation distortion and linkages of *Citrus* and *Poncirus* isozyme genes.
J. Heredity, 76, 289-294.
- VARDI (A.), SPIEGEL-ROY (P.) and GALUN (E.). 1975.
Citrus cell culture isolation of protoplasts, planting densities, effect of mutagens and regeneration of embryos.
Plant Sci. Lett., 4, 231-236.
- VARDI (A.) and SPIEGEL-ROY (P.). 1982.
Plant regeneration from *Citrus* protoplasts : Variability in methodological requirements among cultivars and species.
Theor. Appl. Genet., 62, 171-176.
- VARDI (A.), HUTCHISON (D.J.) and GALUN (E.). 1986. -
A protoplast to tree system in *Citrocitrus* based on protoplasts derived from a sustained embryogenic callus.
Plants Cell Reports, 75, 51-58.
- VARDI (A.), BREIMAN (A.) and GALUN (E.). 1987.
Citrus hybrids : production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles.
Theor. Appl. Genet., 75, 51-58.
- VARDI (A.), ARZEE-GONEN (P.), FRYDMAN-SHANI (A.), BLEISHMAN (S.), and GALUN (E.). 1989.
Protoplast-fusion-mediated transfer of organelles from *Microcitrus* into *Citrus* and regeneration of novel alloplasmic trees.
Theor. Appl. Gen., 78, 741-747.
- WAKANA (S.), IWAMASA (M.) and UEMOTO (S.). 1982.
Seed development in relation to ploidy of zygotic embryo and endosperm in polyembryonic citrus.
1981 Proc. Int. Soc. Citric., 1, 35-39.
- WHU (S.), LIANG (J.), LIN (Z.), TANG (X.) and ZENG (S.). 1986.
Using gamma ray to induce mutation for seedlessness in citrus.
Mut. Breed. Newsl., 27, 14.
- WUTSCHER (H.K.). 1979.
Citrus rootstocks.
Horticultural Reviews, 1, 237-269.

MEJORAMIENTO DE LOS CITRICOS :
II.- CREACIONES VARIETALES Y BIOTECNOLOGIAS.

P. OLLITRAULT y Dominique de ROCCA SERRA.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 124-134.

RESUMEN - Después de un repaso de los objetivos de los programas de creación varietal, este trabajo resena casi siglo de mejoramiento genético de los cítricos. Los criterios y los métodos de selección son presentados sobre la base de una síntesis bibliográfica con énfasis en las nuevas biotecnologías (marcación molecular, embriogenia somática, protoplastos ...) que podrían, en un futuro cercano, desembocar en progresos genéticos notables.