

Fusion de protoplastes chez les agrumes

P. OLLITRAULT¹, D. DAMBIER¹, C. CABASSON², C. TEISSON² ET F. LURO³

(1) CIRAD-FLHOR, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 01, France.

(2) CIRAD-BIOTROP, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 01, France.

(3) SRA San Giuliano, INRA/CIRAD-FLHOR, 20230 San Nicolao, France.

La fusion de protoplastes, qui permet d'obtenir des hybrides somatiques interspécifiques et intergénériques ou des cybrides, est une voie de recherche pleine d'avenir pour l'amélioration des porte-greffe et des cultivars d'agrumes.

introduction

La fusion de protoplastes joue un rôle croissant dans les programmes d'amélioration des agrumes (OLLITRAULT et LURO, 1995). Elle permet en effet de contourner certaines contraintes associées à l'hybridation sexuée et trouve son application dans la création de porte-greffe et de cultivars destinés à une agrumiculture durable et de qualité dans le respect de l'environnement.

Dans le cadre de l'amélioration des porte-greffe, elle autorise le cumul des gènes de résistances ou de tolérances aux facteurs biotiques et abiotiques, quel que soit le niveau d'hétérozygotie des géniteurs.

Les ressources génétiques directement utilisables sont également très larges puisque la fusion de protoplastes permet de combiner des génomes d'espèces ou de genres sexuellement incompatibles (GMITTER *et al.*, 1992).

Cette technique apparaît aussi prometteuse pour la diversification des cultivars au niveau triploïde et cela plus particulièrement dans le groupe des mandariniers (OLLITRAULT *et al.*, 1995). Le pool des géniteurs tétraploïdes, destinés à la création de cultivars triploïdes par hybridation sexuée avec les diploïdes, pourra en effet être considérablement enrichi.

La restauration de la fertilité chez des hybrides somatiques obtenus à partir de cultivars élites stériles a par ailleurs été observée (OHGAWARA *et al.*, 1991). Les résultats obtenus par le CIRAD¹ dans ce domaine sont présentés.

obtention d'hybrides somatiques intergénériques

Les travaux engagés en France depuis 5 ans par le CIRAD-FLHOR², le CIRAD-BIOTROP³ et l'INRA⁴ (station de recherches agronomiques de San Giuliano en Corse) sur l'embryogenèse des agrumes se sont concrétisés en 1994 par l'obtention des premiers hybrides intergénériques *Citrus reticulata* (mandarinier) + *Fortunella japonica* (kumquat) dans le laboratoire du CIRAD-BIOTROP. Une centaine de plantes ont en effet été régénérées après électrofusion de protoplastes de cals embryogènes de *C. reticulata* et de protoplastes de feuilles de *F. japonica* (photos 1 à 3).

Le niveau de ploïdie de ces plantes a été vérifié par cytométrie en flux (figure 1), tandis que l'analyse des isozymes confirmait leur nature hybride. Ces hybrides tétraploïdes pourraient permettre, par hybridation sexuée avec des cultivars diploïdes, d'introgesser les arômes, la tardiveté et les tolérances au froid et au chancre citrique du kumquat dans des cultivars triploïdes de type mandarinier.

identification de cybrides

Dans le cadre d'une collaboration avec l'IFAS⁵ (Pr. J. Grosser, Floride aux Etats-Unis), des cybrides diploïdes (génome nucléaire d'une espèce associé aux génomes cytoplasmiques d'une autre espèce) ont été

identifiés grâce à 2 techniques : la cytométrie en flux et l'analyse des marqueurs RFLP du noyau et du cytoplasme (photos 4 et 5) de plantes régénérées à partir de fusions entre des protoplastes de cal de *C. deliciosa* et des protoplastes de feuilles de *C. sinensis* (oranger) d'une part, et des protoplastes de cal de *C. deliciosa* et des protoplastes de feuilles de *C. paradisi* (pomelo) d'autre part (LURO *et al.*, 1995).

Cette étude a révélé la présence systématique des génomes mitochondriaux et chloroplastiques non recombinés du parent *C. deliciosa* (issu de cal embryogène) associés aux génomes nucléaires de *C. deliciosa*, *C. sinensis* ou *C. paradisi*.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par TUSA *et al.* (1990) et SAITO *et al.* (1993). Ils témoignent d'un déterminisme cytoplasmique de l'aptitude à la régénération par embryogenèse somatique chez les agrumes. Les cybrides obtenus constituent par ailleurs un matériel de choix pour évaluer le rôle des génomes cytoplasmiques et des interactions nucléo-cytoplasmiques dans l'établissement des caractères phénotypiques.

perspectives

Des fusions somatiques de diverses combinaisons interspécifiques [*C. reticulata* + *C. sinensis* ; *C. reticulata* + *C. paradisi* ; *C. reticulata* + *C. lemon* (citronnier) ; *C. reticulata* + *C. aurantifolia* (lime)] et intergénérique

(*C. reticulata* + *Poncirus trifoliata* et *C. aurantium* + *Eremocitrus glauca*) ont été réalisées et sont en cours de régénération. Ces combinaisons destinées à l'amélioration des porte-greffe ou des cultivars apporteront également de précieuses informations sur la génétique des polyploïdes.

Des tentatives de fusions entre protoplastes diploïdes et protoplastes haploïdes (issus de plantules haploïdes obtenues par gynogenèse induite) devraient être effectuées prochainement afin de synthétiser directement des triploïdes. L'origine des plantes régénérées pour ces différents programmes sera contrôlée grâce au marquage moléculaire et à la cytométrie en flux. L'ensemble du matériel végétal créé par fusion de protoplastes rentrera ensuite dans le réseau d'évaluation multilocal du CIRAD-FLHOR et de l'INRA pour en estimer le potentiel en conditions méditerranéennes et tropicales ainsi que la tolérance aux principales maladies. ●

(1) CIRAD = Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

(2) CIRAD-FLHOR = Département des productions fruitières et horticoles.

(3) CIRAD-BIOTROP = Laboratoire des biotechnologies appliquées à l'amélioration des plantes tropicales.

(4) INRA = Institut national de la Recherche agronomique.

(5) IFAS = Institute of Food and Agricultural Sciences (University of Florida).

.....
Bibliographie, illustrations, voir version anglaise p. 401-403