

Amélioration des agrumes et biotechnologie

P OLLITRAULT
CIRAD-FLHOR
BP 5035,
34032 Montpellier cedex
01 France

F LURO
SRA de San Giuliano
INRA/CIRAD
20230 San Nicolao
France

Reçu : février 1995
Accepté : juin 1995

Amélioration des agrumes et biotechnologie.

RÉSUMÉ
L'accroissement des pressions phytosanitaires et la diversification variétale effectuée sur des critères de qualité attendue par le marché sont deux des justifications majeures des programmes d'amélioration des agrumes à travers le monde. Ces derniers se sont longtemps heurtés aux contraintes spécifiques du système de reproduction des agrumes. Le développement des techniques de marquage moléculaire et de biologie cellulaire, en particulier celles associées à l'embryogenèse somatique, ouvre aujourd'hui des perspectives très prometteuses pour apporter une solution variétale aux grands enjeux de l'agrumiculture. L'apport des biotechnologies dans le domaine de l'amélioration des agrumes, replacé dans le contexte de ses objectifs et des contraintes associées à l'amélioration conventionnelle, est présenté sur la base d'une synthèse bibliographique.

Citrus breeding and biotechnology.

ABSTRACT
The increase in pest and disease pressure and varietal diversification, based on market quality criteria, are two major motives for developing citrus improvement programmes worldwide. These programmes have long been hindered by specific constraints concerning the citrus reproductive system. The development of molecular marking and cell biology techniques, especially in conjunction with somatic embryogenesis, should address the major challenges in citrus culture and provide varietal solutions. Biotechnology applications in citrus breeding programmes, within the context of the above described aims and constraints associated with conventional breeding, is presented in the form of a bibliographical synthesis.

Mejoramiento de los agrios y biotecnología.

RESUMEN
Dos de las mayores justificaciones de los programas de mejoramiento de los agrios a través el mundo son el aumento de los problemas fitosanitarios y la diversificación varietal efectuada sobre criterios de calidad esperada por el mercado. Durante mucho tiempo estos programas se han enfrentado a los apremios específicos del sistema de producción de los agrios. El desarrollo de la técnica de los marcadores moleculares y de la biología celular, particularmente las técnicas asociadas a la embriogenesis somática, abre hoy día perspectivas muy prometedoras para aportar una solución varietal a los grandes objetivos de la citricultura. La aportación de las biotecnologías en el sector del mejoramiento de los agrios, situado en el contexto de sus objetivos y de sus apremios asociados al mejoramiento convencional, se presenta sobre una base de síntesis bibliográfica.

Fruits, 1995, vol 50, p 267-279
© Elsevier, Paris

MOTS CLÉS
Citrus, biotechnologie, méthode d'amélioration, culture *in vitro*, technique de culture, marqueur génétique, hybridation somatique, haplométhode, transformation génétique.

KEYWORDS
Citrus, biotechnology, breeding methods, vitroculture, culture techniques, genetic markers, somatic hybridization, haplomethods, genetic transformation.

PALABRAS CLAVES
Citrus, biotecnología, metodos de mejoramiento, cultivo *in vitro*, tecnicas de cultivo, marcadores geneticos, hibridación somatica, metodo haploide, transformación genetica.

● introduction

Avec 82 Mt produites en 1994 (ANONYME, 1995), les agrumes constituent, en volume, la première production fruitière mondiale et dépassent ainsi celle des raisins et des bananes. L'aire agrumicole actuelle est elle-même très vaste ; elle se situe approximativement entre les 40° latitude N et S, tout autour du monde. La superficie totale plantée en agrumes est évaluée à plus de 3 M ha. Les principaux pays producteurs sont le Brésil (15 Mt), les États-Unis (9 Mt) et la Chine (4 Mt). Les oranges représentent la plus grande part de cette production (71%) ; suivent les citrons et les limes (13%), les petits agrumes – tangérines, mandarines, clémentines, etc – (10%) et les pomélos (6%). Le volume de fruits transformés, en constante augmentation, est évalué à 35% de la production totale. Dans le futur, la consommation devrait connaître une progression plus rapide dans les pays en développement que dans les pays développés. Cette expansion du marché des agrumes contraint les pays producteurs à s'impliquer dans une politique de création variétale afin d'élargir leur gamme de produits sur des critères de qualité, et de répondre à l'extension des contraintes biotiques et abiotiques.

● amélioration des agrumes

objectifs d'amélioration et dispersion des gènes et génomes d'intérêt agronomique

Les objectifs d'amélioration sont nombreux ; ils sont différents selon que l'on s'adresse aux cultivars ou aux porte-greffes.

Pour les cultivars, les qualités organoleptiques (arômes, teneur en sucre et acidité) sont importantes pour le fruit frais et la transformation. Les aspects pomologiques (calibre, aspermie, coloration, facilité d'épluchage) sont essentiels pour le marché du frais. L'étalement de la production (gamme variétale) et les résistances aux maladies sont également recherchés.

En revanche, l'adaptation aux conditions pédoclimatiques et la tolérance aux pathogènes est le premier objectif qui guide la sélection des porte-

greffes. Le choix du porte-greffe est également déterminant pour l'établissement du rendement et de la qualité des fruits (JACQUEMOND et BLONDEL, 1986).

résistance au froid

Depuis de nombreuses années, *Poncirus trifoliata* a été utilisé comme source de résistance au froid. Plus récemment, de nouveaux programmes ont débuté aux États-Unis, utilisant des *Eremocitrus* et des kumquats. Les mandariniers Satsuma et les *Citrus junos* (Yusu), résistants au froid, sont également utilisés comme géniteurs pour l'amélioration des cultivars. *C. inchangensis* pourrait également être une source de résistance.

tolérance à la salinité

La tolérance à la salinité est un des objectifs de la sélection de porte-greffe. Le mandarinier Cléopâtre et le limetier Rangpur sont utilisés à cet effet, soit directement, soit comme géniteurs. Des résistances au sel sont également présentes chez *Severinia buxifolia*, *Eremocitrus glauca*, et *Limnocitrus littoralis* ; les deux premiers sont par ailleurs tolérants aux excès de bore.

tolérance et résistance aux maladies et parasites

La principale source de résistance aux *Phytophthora* sp et aux nématodes est le *Poncirus*. Des résistances ont également été trouvées chez *Citrus grandis* et *C. aurantifolia* ainsi que dans les genres *Severinia* et *Citropsis*. Pour la Tristeza, importante maladie virale, la meilleure source de résistance trouvée est également le *Poncirus*. *Citrus sinensis* est tolérant au blight (maladie de dégénérescence). *Muraya paniculata* serait tolérant au greening (maladie bactérienne), de même que des résistances aux acariens phytophages ont été trouvées chez les mandariniers Satsuma et Dancy et le pomélo Marsh.

physiologie

Certains *Microcitrus* présentent une bonne aptitude à pousser dans des sols pauvres en azote organique. Par ailleurs, les genres *Feronia* et *Feroniella* stimulent une première floraison précoce lorsqu'ils sont utilisés comme porte-greffes.

Les différents genres des *Aurantioideae* qui présentent un intérêt certain pour la pharmacopée, les arômes, les huiles essentielles, etc, ont, d'une

manière générale, été insuffisamment caractérisés pour leurs tolérances aux facteurs biotiques et abiotiques limitant la culture des agrumes. Il est cependant probable qu'ils constituent un réservoir génétique important pour les futurs programmes d'amélioration.

stratégies de création variétale conventionnelles

Tirant parti de la multiplication végétative, les améliorateurs se sont limités, la plupart du temps, 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 seul cycle.

mutation

La sélection de mutations spontanées est la méthode la plus anciennement utilisée pour l'amélioration des agrumes. Elle a fourni pour le clémentinier, en Espagne (BONO *et al.*, 1982), au Maroc et en Corse, de bons résultats pour l'étalement de la période de récolte, l'amélioration des calibres ou de la coloration des fruits. Des résultats équivalents ont été obtenus pour le mandarinier 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 ou des pomélos. La mutagenèse induite s'est avérée un bon outil pour la recherche de cultivars aspermes. De tels mutants ont ainsi été obtenus par HEARN (1984) et WHU *et al.* (1986). Quelques mutants de coloration ont également été obtenus : le pomélo rouge et asperme Star-Ruby, est issu d'un programme d'irradiation (HENSZ, 1960).

recombinaison sexuée

Les premiers programmes importants de création variétale par hybridation ont été entrepris par l'USDA en Floride à partir de 1893. Ils étaient orientés vers la recherche de résistances aux maladies et au froid. Le recours à *Poncirus trifoliata* comme source de résistance au froid n'a pas permis d'obtenir des cultivars comestibles, car il induisait des teneurs en huiles essentielles très élevées dans les hybrides. Certains hybrides *Poncirus x Citrus* se sont avérés, en revanche, de très bons porte-greffes comme, par exemple, certains

citrumélos (*Poncirus x pomélo*) et surtout les citranges Troyer et Carrizo (*Poncirus x oranger*). Des cultivars de bonne qualité ont été sélectionnés parmi des hybrides entre pomélos et mandariniers (tangelo Nova, Orlando et Minneola). Quelques hybrides entre mandariniers se sont également révélés intéressants (Fairchild, Frémont, Fortune, Wilking, Honey, etc).

polyploïdie

La quasi-totalité des agrumes et des genres apparentés sont diploïdes ($2n = 2x = 18$; KRUG, 1943). L'objectif principal des travaux menés sur la polyploïdie a été l'obtention de cultivars triploïdes aspermes, à l'image du limetier Tahiti qui est un triploïde spontané. De nombreux travaux ont été réalisés pour obtenir des triploïdes par hybridations entre diploïdes et tétraploïdes spontanés (BARRET et HUTCHISON, 1978 ; CAMERON et SOOST, 1969 ; ESEN et SOOST 1977). Des triploïdes ont également été recherchés dans des descendances de croisements entre diploïdes (ESEN et SOOST, 1977a). Peu de cultivars commerciaux triploïdes sont issus de ces différents programmes. Les principaux sont les hybrides pamplemoussier x pomélo : Melogold et Oroblanco (SOOST et CAMERON, 1985). Des tangors intéressants ont été récemment sélectionnés par STARRANTINO (1994) et cette approche reste très prometteuse pour la diversification des agrumes à petits fruits de type mandarine.

limites de l'amélioration conventionnelle

Certains éléments caractérisant le système de reproduction des agrumes ont constitué un frein important à l'amélioration par voie sexuée.

polyembryonie

Chez de nombreux cultivars, les graines contiennent plusieurs embryons ; les embryons surnuméraires sont issus des cellules du nucelle. Seules deux espèces (*C medica* et *C grandis*) ne présentent que des cultivars monoembryonnés. Pour les autres, le degré de polyembryonie peut varier de manière importante suivant les variétés. La polyembryonie conduit à l'obtention, dans les semis, d'une proportion élevée de plantes nucléaires possédant le génotype maternel. Elle limite ainsi les effectifs des populations recombinantes

analysées, et donc la probabilité d'obtenir des génotypes élités par hybridation entre cultivars polyembryonnés. Cette contrainte a réduit significativement la base génétique exploitée en conduisant les améliorateurs à ne retenir généralement que des géniteurs femelles monoembryonnés (SOOST, 1987).

stérilité gamétique

Les stérilités mâles et femelles ont été sélectionnées par les agrumiculteurs, car elles entraînent la production de fruits aspermes. La stérilité pollinique est ainsi très souvent présente à des degrés variables. L'exemple de stérilité mâle le plus connu est celui de l'oranger Washington Navel. De plus, chez de nombreux cultivars comme les pomélos Marsh et Thompson ou le citronnier Eureka, la proportion de pollen viable est faible (5 à 15%). La stérilité femelle est, quant à elle, plutôt due à une mauvaise évolution des tissus gamétiques qu'à une absence d'organes reproducteurs (mandarinier Satsuma, orangers Washington Navel, Hamlin, Valencia et pomélo Marsh). Ces stérilités interdisent l'utilisation de nombreux cultivars élités comme géniteurs.

incompatibilité gamétophytique

Auto- et inter-incompatibilité sont présents chez les agrumes. Tous les pamplemoussiers sont auto-incompatibles ; plusieurs hybrides, ou supposés tels, le sont également (les tangelos Orlando et Minneola, les cultivars Robinson, Nova, Page, Fairchild, le clémentinier). Certains cultivars d'orangers et de citronniers le seraient également. La plupart des hybrides entre cultivars auto-incompatibles présentent ce même caractère. Ces résultats sont cohérents avec une incompatibilité de type gamétophytique. Ce système interdit certaines combinaisons parentales et limite les phases d'autofécondation dans les schémas d'amélioration.

compatibilité sexuelle

Des hybrides, présentant une fertilité plus ou moins importante, peuvent être obtenus entre les différentes espèces du genre *Citrus*. Les premiers hybrides intergénériques entre *Citrus* et *Poncirus* et *Citrus* et *Fortunella* ont été produits par l'USDA dès 1897. Depuis, de très nombreuses combinaisons ont été testées (IWAMASA *et al*, 1989). Ces travaux ont démontré une bonne compatibilité

sexuelle entre *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* et *Microcitrus* ; les hybrides intergénériques présentent toutefois généralement une faible fertilité qui limite considérablement les possibilités d'amélioration sur plusieurs cycles de recombinaison. Les hybridations réalisées avec des genres plus éloignés (*Glycosmis*, *Murraya*, *Triphasia*, *Severinia*, *Hesperethusa*) n'ont pas produit de graines (IWAMASA *et al*, 1989).

Par ailleurs, la longueur de la phase juvénile, l'encombrement des descendances, la méconnaissance du déterminisme génétique de la plupart des caractères, ainsi que la dépression de consanguinité chez les cultivars polyembryonnés, ont été autant de facteurs défavorables pour la mise en œuvre des stratégies d'amélioration par voie sexuée. Il apparaît enfin que les caractéristiques d'espèces comme les orangers, les citronniers ou les pomélos reposent sur des structures polygéniques complexes à haut niveau d'hétérozygotie. Les marqueurs moléculaires ont également démontré que la diversification au sein de chacune de ces « espèces » s'était faite par accumulation de mutations à partir d'un génotype ancestral, sans intervention de la recombinaison sexuée. Ces structures limitent considérablement les probabilités de succès d'amélioration par voie sexuée.

● apport des biotechnologies

Les récents développements des outils de biologie cellulaire et moléculaire permettent d'une part d'envisager une efficacité accrue des programmes d'amélioration conventionnelle et d'autre part d'explorer des voies de création variétale totalement nouvelles (tableau I).

marquage moléculaire

Les marqueurs moléculaires se divisent en trois grandes classes :

- (1) les métabolites secondaires (polyphénols, arômes, huiles essentielles, etc) analysés par chromatographie ou résonance magnétique nucléaire ;
- (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

Tableau I
Applications des outils de la biologie cellulaire et moléculaire aux différentes stratégies d'amélioration.

	Marqueurs moléculaires	Cytométrie en flux	Sauvetage d'embryons	Haplométhodes	Embryogenèse somatique	Protoplastes
Gestion du germoplasme	+	+				
Hybrides sexués	+		+	+		
Hybrides somatiques	+	+			+	+
Cultivars triploïdes	+	+	+	+	+	+
Plantes transgéniques	+				+	+

(RFLP) ou *via* les techniques d'amplification par PCR (RAPD, AFLP, PCR ciblée, etc).

Les métabolites secondaires ont été étudiés principalement à des fins taxonomiques (SCORA, 1989) et pour la discrimination des plants zygotiques et nucellaires (ESEN et SOOST, 1977b, WEINBAUM *et al*, 1982). Cependant, seules les deux dernières classes de marqueurs peuvent être assimilées à des marqueurs génétiques dont le polymorphisme peut être directement relié 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 sont analysables en routine à partir de feuilles ou d'écorces et apportent des informations sur le polymorphisme d'une vingtaine de loci (ROOSE, 1989 ; OLLITRAULT *et al*, 1992, 1994c). Plus récemment les techniques RFLP (ROOSE, 1989 ; LURO, 1993) et RAPD (LURO *et al*, 1994a) ont été développées ; elles augmentent considérablement la puissance du marquage génétique chez les agrumes.

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

étude 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 al*, 1994c). Elle a ainsi permis d'analyser le taux d'apomixie de différents porte-greffes (ROOSE, 1989) et de sélectionner les plants zygotiques dans les programmes d'hybridation entre espèces polyembryonnées. L'utilisation de la PCR avec des amorces de type minisatellite ou microsatellite paraît prometteuse pour les génotypes faiblement hétérozygotes (LURO *et al*, 1995b).

L'analyse du polymorphisme enzymatique peut également être utilisée dans le cadre de programme de biologie cellulaire pour s'assurer de l'origine des cals embryogènes obtenus par culture d'ovules (OLLITRAULT *et al*, 1992), ou pour vérifier l'origine des plantes régénérées dans les programmes de fusion somatique (BEN HAYIM *et al*, 1982 ; GROSSER *et al*, 1988 ; OLLITRAULT *et al*, 1994a). Le RFLP a également été utilisé dans ce cadre (KOBAYASHI *et al*, 1988) ; il est particulièrement utile pour les programmes de fusions asymétriques (VARDI *et al*, 1987) et l'identification de cybrides (LURO *et al*, 1995a) grâce à l'utilisation de sondes cytoplasmiques.

étude de l'organisation de la diversité génétique

Le polymorphisme enzymatique, le RFLP et le RAPD sont performants pour l'identification de cultivars issus d'hybridation. En revanche, la discrimination de mutants d'un même génotype ancestral (ex : les différents cultivars d'orangers) est très rarement obtenue (TORRES *et al*, 1978 ; ROOSE, 1989 ; LURO *et al*, 1995b). Le développement des techniques d'AFLP (*amplification fragment length polymorphism*), l'analyse du VNTR (*variable number tandem repeat*) ou l'étude des transposons pourrait permettre d'accroître le pouvoir de discrimination.

Les marqueurs moléculaires ont mis en évidence des structures intraspécifiques (hétérozygotie, diversité allélique et génotypique) très contrastées (ROOSE, 1989). Ils confirment également la structuration du genre *Citrus* autour de trois pôles ancestraux : *C medica*, *C reticulata* et *C grandis* (HANDA *et al*, 1986 ; GREEN *et al*, 1986 ; YAMAMOTO *et al*, 1993). Cette structure avait été proposée précédemment sur la base d'une étude de taxonomie numérique (BARRET et RHODES, 1976). Ces données mettent en lumière l'impor-

tance des mandariniers et des pamplemoussiers pour la conservation d'une large diversité génétique ; elles sont primordiales pour l'établissement des schémas d'amélioration au sein de chaque espèce.

cartographie du génome

Les nouveaux outils permettent de réaliser le marquage de l'ensemble du génome et donc, par l'analyse des taux de recombinaison sur des descendances contrôlées, de localiser les gènes déterminant les caractères monogéniques ainsi que les gènes majeurs contrôlant la variance génétique des caractères quantitatifs (QTLs ; PERRIER *et al*, 1992). Plusieurs cartes du génome des agrumes associant isozymes, RFLP (photo 1) et RAPD ont été publiées (DURHAM *et al*, 1992 ; JARRELL *et al*, 1992 ; LURO *et al*, 1994 b ; CAI *et al*, 1994). Ces travaux ont mis en évidence de très nombreuses distorsions de ségrégations et ont, en particulier, permis de localiser le gène d'immunité à la tristezza dans le génome du *Poncirus* (GMITTER *et al*, 1994 ; CHENG *et al*, 1994) et un gène de nanisme du *Poncirus* Flying dragon (CHENG et ROOSE, 1994). Les programmes de cartographie conforteront significativement les programmes d'amélioration par voie sexuée (sélection assistée par marqueurs) et, à plus long terme, les gènes ainsi localisés pourront être isolés en vue de la transformation génétique. Les cartes génétiques permettent, par ailleurs, de choisir des marqueurs couvrant l'ensemble des chromosomes afin d'analyser finement l'origine des plantes diploïdes régénérées dans des programmes de fusion somatique (LURO *et al*, 1995a). Enfin, la cartographie comparée des génomes des différentes espèces devrait apporter des informations très intéressantes sur l'évolution des agrumes.

cytométrie en flux

La cytométrie en flux, développée récemment sur les agrumes (OLLITRAULT et MICHAUX-FERRIERE, 1994 ; LUCRETTI *et al*, 1994), a deux applications principales.

analyse de la taille du génome

L'étude de noyaux, marqués avec des colorants spécifiques des acides nucléiques, a mis en évidence des variations de la taille des génomes haploïdes, au sein des différentes espèces du genre *Citrus* (OLLITRAULT *et al*, 1994b). La principale

application de cette technique est toutefois l'étude du niveau de ploïdie de plantules issues de semis ou de fusions somatiques (STARRANTINO *et al*, 1994b ; OLLITRAULT *et al*, 1994a). Compte tenu de sa rapidité de mise en œuvre, cette technique autorise en effet la recherche d'événements de polyploïdisation spontanée ou induite relativement rares. Des plantules tétraploïdes ont ainsi été identifiées dans des semis de diploïdes polyembryonnés (OLLITRAULT et JACQUEMOND, 1994), tandis que des plantes triploïdes ont été sélectionnées dans des descendances d'hybridations contrôlées entre diploïdes (OLLITRAULT *et al*, 1995). La cytométrie en flux apparaît, dans ce cadre, une technique tout à fait complémentaire de celle des isozymes et des RFLP qui sont, pour leur part, d'excellents marqueurs de la recombinaison sexuée.

identification et tri des hétérofusions dans les programmes de fusion somatique

La définition des paramètres d'électrofusion a pu être améliorée grâce à une évaluation précise de la fréquence des hétérofusions au stade protoplaste (OLLITRAULT *et al*, 1995). Ces travaux tirent partie, sous rayonnement UV, de la fluorescence rouge des chloroplastes des protoplastes de feuilles du premier parent, opposée à la fluorescence verte des protoplastes de calcs colorés au FDA (fluorescéine diacétate) du second parent. Ainsi, seules les hétérofusions présentent une double fluorescence dans le mélange de protoplaste après fusions. Ces travaux déboucheront sur un tri des hétérofusions en condition stérile. Cette technique devrait ainsi limiter les problèmes de compétitions entre les cellules diploïdes parentales et les cellules tétraploïdes hybrides.

systèmes de régénération *in vitro*

microgreffage d'apex et assainissement du germoplasme

L'assainissement du matériel végétal est une composante importante de la gestion du germoplasme agrumes. Celui-ci a longtemps été réalisé par sélection de plantes d'origine unicellulaire (CASSIN et LOSSOIS, 1977). Cette technique n'était toutefois pas adaptée aux cultivars monoembryonnés ou stériles. Par ailleurs, le passage par l'embryon

est associé à des caractères de juvénilité défavorables. La culture de méristèmes d'agrumes s'étant avérée peu efficace, l'assainissement est aujourd'hui classiquement réalisé par thérapie associée au microgreffage d'apex sur de jeunes porte-greffes *in vitro* (NAVARRO, 1982 ; VOGEL *et al.*, 1988).

sauvetage d'embryons

La culture *in vitro* d'embryons de pépins à divers stades de développement a deux applications principales. La première est l'obtention de plantules hybrides dans des croisements entre variétés polyembryonnées. La seconde est le sauvetage d'embryons polyplœides.

Il est possible de sauver les embryons à des stades de développement précoce comme le stade cordiforme (RANGAN *et al.*, 1969) ou globulaire (STARRANTINO et RUSSO, 1980). RANGAN *et al.* (1969) ont ainsi obtenu des plantules hybrides issues de croisements entre variétés polyembryonnées. La culture d'ovules fécondés de cultivars polyembryonnés prélevés 3 semaines après anthèse a également permis d'obtenir des plantules hybrides (OLLITRAULT *et al.*, 1992).

Des plantules triploïdes, issues d'hybridations de cultivars monoembryonnés diploïdes par du pollen de tétraploïdes, ont pu être obtenues par sauvetage d'embryons immatures prélevés trois à quatre mois après anthèse (STARRANTINO et RECUPERO, 1982), ou d'embryons prélevés dans des graines mal développées trouvées dans les fruits mûrs (OYAMA *et al.*, 1982). Le développement anormal *in vivo* des embryons issus de ce type de croisement serait lié à un ratio défavorable (4/3) des niveaux de ploïdie de l'albumen et de l'embryon (ESEN et SOOST, 1977a).

Des polyplœides spontanés ont également pu être obtenus après sauvetage *in vitro* des embryons des graines mal développées de cultivars polyembryonnés (autotétraploïdes issus du doublement chromosomique des tissus nucellaires ; OLLITRAULT *et al.*, 1995) et monoembryonnés (triploïdes sans doute issus de la fécondation d'ovules diploïdes ; OLLITRAULT *et al.*, 1995).

embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique des génotypes polyembryonnés du genre *Citrus* est maîtrisée depuis le début des années 1970. La culture *in vitro*

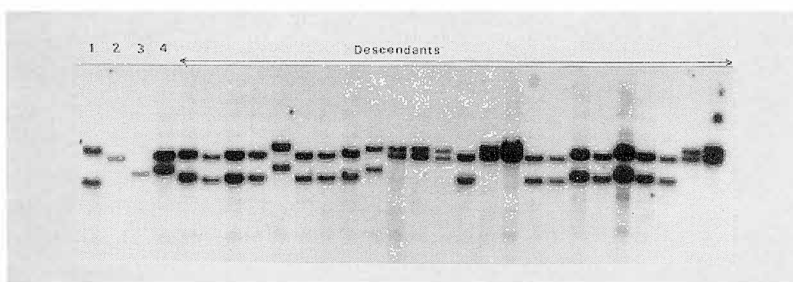


Photo 1
Ségrégation de marqueurs RFLP dans une descendance d'hybridation contrôlée intergénérique *Citrus grandis* x (*C. reshni* x *Poncirus trifoliata*).
1 : *C. grandis* ;
2 : *C. reshni* ;
3 : *P. trifoliata* ;
4 : *C. reshni* x *P. trifoliata*.

d'ovules, fécondés ou non, permet d'amplifier le phénomène naturel d'apomixie, soit directement (BUTTON et BORNMAN, 1971), soit après passage par cal (KOCHBA et SPIEGEL-ROY, 1977b). 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.*, 1982). 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). En revanche, pour les cultivars polyembryonnés, aucune variation somaclonale n'a été observée sur les plants régénérés par culture d'ovules (STARRANTINO et RUSSO, 1983), voire même après régénération à partir de protoplastes isolés de cals embryogènes repiqués depuis plusieurs années (KOBAYASHI, 1987).

La nature des sucres (HIDAKA et OMURA, 1989 ; CABASSON *et al.*, 1995) ou des hormones (KOCHBA et SPIEGEL-ROY, 1977b), ajoutés aux milieux, permet d'orienter les cultures de cals nucellaires soit vers la multiplication de ce cal, soit vers la régénération d'embryons.

Les souches de cals embryogènes sont repiquées mensuellement ou cryoconservées dans l'azote liquide (SAKAI *et al.*, 1991 ; ENGELMANN *et al.*, 1994). Elles constituent le cœur des programmes de création variétale faisant appel à l'embryogenèse somatique (mutagenèse, fusion somatique, transformation génétique). Après avoir subi des traitements mutagènes, ces cals embryogènes ont

été soumis à des pressions de sélection ; ils ont permis de régénérer des plantes plus tolérantes au sel (KOCHBA *et al*, 1982 ; SPIEGEL-ROY et BEN HAYIM, 1985), ou à la toxine du mal secco (NACHMIAS *et al*, 1977 ; GENTILE *et al*, 1994). L'application des traitements mutagènes sur les cals embryogènes pourrait, par ailleurs, permettre d'éviter la formation de chimères (OLLITRAULT, 1994).

Des plantules triploïdes ont également été régénérées par embryogenèse somatique à partir d'albumen (GMITTER *et al*, 1990).

Le greffage d'embryons somatiques (OLLITRAULT, 1992) ou de petits vitroplants assure un gain de temps important par rapport à la voie classique ; il pourrait permettre d'accélérer les travaux de sélection des cultivars grâce à un raccourcissement de la phase juvénile.

haplométhodes

Les travaux sur l'haploïdie ont été peu nombreux. Ils pourraient toutefois connaître un regain d'intérêt pour la réalisation de fusions d'haploïdes et de diploïdes, ainsi que 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 culture d'anthères de *Poncirus trifoliata* (HIDAKA *et al*, 1979), de Calamondin (CHEN *et al*, 1980), d'orangers Trovita (HIDAKA et KAJIURA, 1989) et de clémentiniers (GERMANA, 1994). Des travaux récents (OLLITRAULT *et al*, 1996) ont permis d'obtenir des plantules et des cals haploïdes de clémentinier par gynogenèse induite par du pollen irradié. Les haploïdes obtenus par androgenèse et gynogenèse sont généralement très peu vigoureux. Un greffage précoce permet toutefois d'assurer leur croissance (photo 2).

hybridation somatique

La forte aptitude à l'embryogenèse des cals nucléaires d'agrumes 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 par fusion de protoplastes de feuilles de *Poncirus* et de protoplastes de cals embryogènes d'orangers. Depuis, de nombreux hybrides somatiques ont été réalisés par diverses équipes, tant au niveau intragénérique qu'intergénérique (KOBAYASHI *et al*, 1988 ; GROSSER, 1990 ; TUSA *et al*, 1990 ; OLLITRAULT *et al*, 1994b ; photo 3). Ces travaux ont permis de surmonter des stérilités gamétiques (ex : oranger Washington Navel + mandarinier Satsuma ; KOBAYASHI *et al*, 1988), de restaurer des fertilités (ex : oranger Navel + citrange Troyer ; OHGAWARA *et al*, 1991) et de combiner des génomes sexuellement incompatibles.

Ces différents travaux visent essentiellement la création de porte-greffes cumulant les caractères de résistance des parents et possédant une bonne compatibilité de greffage avec les cultivars. Plusieurs milliers d'hybrides somatiques correspondant à une vingtaine de combinaisons sont en cours d'évaluation agronomique en Floride (GROSSER, 1990 ; GROSSER *et al*, 1992 et 1994). Les hybrides somatiques permettront, par ailleurs, s'ils sont suffisamment fertiles, de diversifier considérablement la gamme des géniteurs tétraploïdes utilisés pour la création de triploïdes (OLLITRAULT *et al*, 1995). Jusqu'à présent, ces géniteurs étaient des autotétraploïdes issus pour l'essentiel de doublements spontanés des tissus nucléaires. L'obtention directe de triploïdes par fusion entre protoplastes haploïdes et diploïdes est également envisagée.

Des fusions asymétriques (VARDI *et al*, 1987) ont été réalisées afin d'analyser les interactions nucléocytoplasmiques. Des cybrides « spontanés » ont également été obtenus relativement fréquemment dans les programmes de fusions intragénériques (TUSA *et al*, 1990 ; SAITO *et al*, 1993 ; LURO *et al*, 1995a ; etc).

transformation génétique

Les recherches sur la transformation génétique sont relativement récentes. Nombre d'entre elles exploitent le système de régénération par embryogenèse somatique. KOBAYASHI et UCHIMIYA (1989) ont réalisé des transferts directs sur protoplastes. Les cals présentant une expression stable du transgène n'ont pas permis de régénérer de

plantule. HIDAKA *et al* (1990) ont régénéré des plants résistants à la Kanamycine et à l'Hygromycine après transformation par coculture de cals embryogènes et d'*Agrobacterium tumefaciens*. STARRANTINO *et al* (1994a) développent le transfert direct par canon à particules sur des cals embryogènes. Des travaux sont également menés sur des systèmes de régénération par organogénèse. MOORE *et al* (1992) ont ainsi transformé des segments de tige par *Agrobacterium*.

Un des rares exemples de transfert de gènes potentiellement utile est celui du gène de la protéine capsidique du virus de la tristeza.

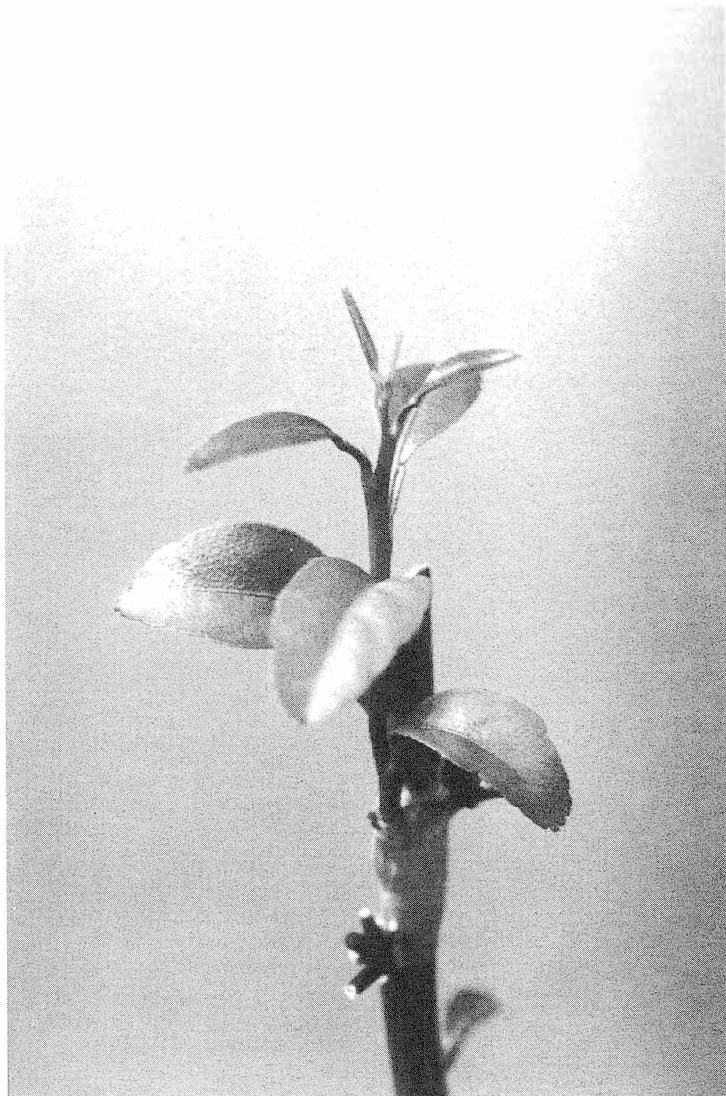
La transformation génétique apparaît comme une stratégie privilégiée pour améliorer des espèces comme les orangers, les pomélos ou les citronniers, compte tenu de leurs structures génétiques. La combinaison de cette technique avec la localisation et l'isolement des gènes majeurs de résistances, présents dans le germoplasme, devrait en étendre considérablement les domaines d'applications.

● conclusions et perspectives

Malgré les nombreux travaux déjà réalisés et la très grande diversité génétique des agrumes offerte aux sélectionneurs, les particularités du régime de reproduction et des structures génétiques de cette plante ont limité considérablement les progrès génétiques par hybridation contrôlée. Les avancées les plus spectaculaires ont été obtenues pour les porte-greffes grâce aux hybridations intergénériques *Poncirus* x *Citrus*. La très grande majorité des cultivars sont, pour leur part, issus de sélection de mutants spontanés.

Le développement des biotechnologies permet toutefois d'être plus optimiste pour les années à venir. Le marquage moléculaire et les techniques *in vitro* sont en effet très prometteurs, soit en soutien aux schémas de sélection classiques, soit par l'introduction de nouvelles approches.

Les techniques de marqueurs moléculaires et de cytométrie en flux permettent de contrôler l'origine des plants dans les programmes d'hybridations sexuées et somatiques. L'application routinière de ces outils autorise, par ailleurs, la



sélection précoce d'événements rares. Les nouveaux schémas d'amélioration par voie sexuée pourront également s'appuyer sur les travaux de cartographie du génome et de sélection assistée par marqueurs. L'hybridation somatique et la cybridation ouvrent la voie à une utilisation large des ressources génétiques et pourraient conduire à une exploitation plus importante des niveaux triploïdes pour les cultivars, et tétraploïdes pour les porte-greffes. La transformation génétique, enfin, devrait répondre au défi que constitue l'amélioration d'espèces comme *C sinensis* (orangers), *C paradisi* (pomélos) ou *C lemon* (citronniers) pour la résistance à certaines maladies.

Photo 2
Clémentinier haploïde, greffé sur *Citrus macrophylla*.

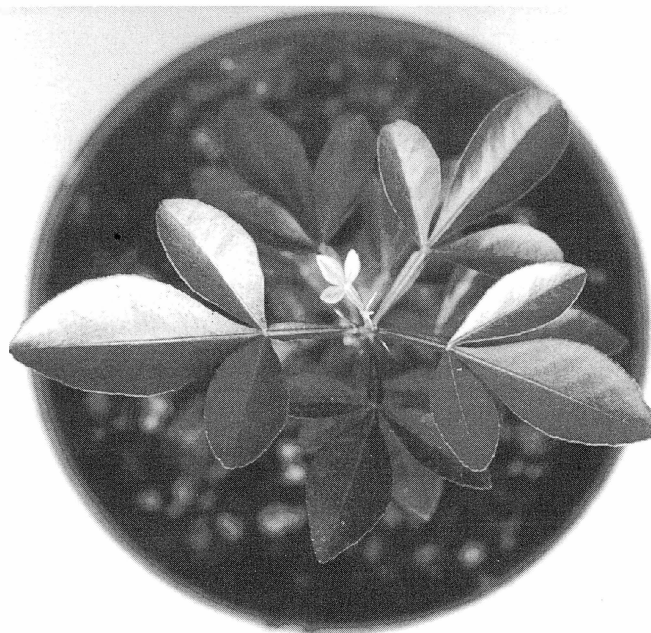


Photo 3
Hybride somatique
intergénérique entre
Citrus deliciosa et
Poncirus trifoliata.

● références

- Anonyme (1995) *In: FAO yearbook. Production 1994. vol 48*. Rome, Italy, FAO, table 71, FAO statistics series No 125.
- Barret HC, Rhodes AM (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. *Syst Bot* 1, 105-136
- Barret HC, Hutchison DJ (1978) Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of citrus. *Econ Bot*, 32, 27-45
- Ben Hayim G, Shani A, Vardi A (1982) Evaluation of isozyme system in citrus to facilitate identification of fusion product. *Theor Appl Genet* 64, 1-5
- Bono R, Fernandez de Cordova L, Soler J (1982) Arrufatina, Esbal and Guillermina, three clementine mandarin mutations recently appearing in Spain. *In: Proc Int Soc Citriculture*, November 9-12, 1981, Tokyo, Japan. Okitsu, Japan, Int Soc Citriculture, 1, 94-96
- Button J, Bornman CH (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, Spiegel-Roy P (1976) Root peroxidase isozymes as an aid in citrus breeding and taxonomy. *Theor Appl Genet* 47, 119-123
- Cai Q, Guy CL, Moore GA (1994) Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theor Appl Genet* 89, 606-614
- Cabasson C, Ollitrault P, Cote FX, Michaux-Ferriere N, Dambier D, Teisson C (1995) Characteristics of citrus cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. *Physiol Plant* 93, 464-470
- Cameron JW, Soost RK (1969) Characters of new populations of citrus polyploids and the relation between tetraploidy in the pollen parent and hybrid tetraploid progeny. *In: Proc 1st Int Citrus Symp*, 1968, Riverside, USA, Univ California, Chapman ed, 1, 199-205
- Cassin J, Lossois P (1977) Method of nucellar selection used in Corsica. *In: Proc 3rd International Citrus Conference, May 1-7 1977, Orlando, Florida, USA*, Int Soc of Citriculture, vol 2, 536-540
- Chen ZQ, Wang MQ, Huihua L (1980) The induction of citrus pollen plants in artificial media. *Acta Genet Sin* 7, 189-191
- Cheng FS, Roose M (1994) Molecular and morphological markers for a dwarfing gene from the citrus rootstock *Poncirus trifoliata* 'Flying dragon'. *In: Plant Genome 2, the international conference of the plant genome, janvier 1994, San Diego, USA*. San Diego, California, USA, Scherago international, inc, p 33
- Cheng FS, Roose M, Federici C, Kupper R (1994) A detailed genetic linkage map including a citrus tristeza virus resistance gene derived from a cross between two intergeneric *Citrus x Poncirus* hybrids. *In: Plant Genome 2, the international conference of the plant genome, janvier 1994, San Diego, USA*. San Diego, California, USA, Scherago international, Inc, p 32

- Durham RE, Liou PC, Gmitter RG, Moore GA (1992) Linkage map of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in citrus. *Theor Appl Genet* 84, 39-48
- Engelmann F, Dambier D, Ollitrault P (1994) Cryopreservation of embryogenic cell suspensions and calluses of citrus using a simplified freezing process. *Cryo-Letters* 15, 53-58
- Esen A, Soost RK (1977a) Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo: endosperm ploidy ratio in citrus. In: *I Congreso mundial de Citricultura*, 1973, Murcia, Valencia, O Carpena ed, Vol II, 53-63
- Esen A, Soost RK (1977b) Separation of nucellar and zygotic seedlings by use of polyphenol oxidase catalysed browning. *Proc Int Soc Citriculture* 2, 616-618
- Gentile A, Tribulato E, Deng ZN, Vardi A (1994) *In vitro* selection of nucellar lemon callus and regeneration of plants tolerant to *Phoma tracheiphilatoxin*. In: *Proc VII International Citrus Congress*, March 8-13, 1992, Acireale, Italy. Catania, Italy, Int Soc of Citriculture, 150-153
- Germana MA (1994) Androgenesis in citrus: a review. In: *Proc VII International Citrus Congress*, March 8-13, 1992, Acireale, Italy. Catania, Italy, Int Soc of Citriculture, 183-189
- Gmitter FG, Ling XB, Deng XX (1990) Induction of triploid citrus plants from endosperm calli *in vitro*. *Theor Appl Genet* 80, 785-790
- Gmitter FG, Xiao SY, Huang S, Hu L, Ling P (1994) Mapping disease resistance genes in citrus: current status. In: *Plant Genome 2, the international conference of the plant genome, janvier 1994, San Diego, USA*. San Diego, California, USA, Scherago international, Inc, p 67
- Green RM, Vardi A, Galun E (1986) The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species, and comparison with related genera. *Theor Appl Genet* 72, 761-769
- Grosser JW (1990) Citrus rootstock improvement by cell fusion. *Citrus and Vegetable Magazine* 9, 28-32
- Grosser JW, Gmitter FG, Chandler, JL (1988) Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* cv Hamlin and *Poncirus trifoliata* cv Flying Dragon. *Plant Cell Reports* 7, 5-8
- Grosser JW, Gmitter FG, Sesto F, Deng XX, Chandler JL (1992) Six new somatic *Citrus* hybrids and their potential for cultivar improvement. *J Am Soc Hort Sci* 117 (1), 169-173
- Grosser J, Louzada ES, Gmitter FG, Chandler JL (1994) Somatic hybridization of complementary *Citrus* rootstocks : five new hybrids. *HortSci* 29 (7), 812-813
- Handa T, Ishizawa Y, Oogaki C (1986) Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. *Jpn J Genet* 61, 15-24
- Hearn CJ (1984) Development of seedless orange, *Citrus sinensis*, cultivar Pineapple and grapefruit, *Citrus paradisi*, cultivars through seed irradiation. *J Am Soc Hort Sci* 109, 270-273
- Hensz RA (1960) Effect of X ray and thermal neutrons on citrus propagating material. *J Rio Grande Val Hort Soc* 14, 21-25
- Hidaka T, Kajiuira I (1989) A simple method for acclimatization of *in vitro* plantlets of *Citrus*. *Bull Fruit Tree Res Stn B* 16, 19-28
- Hidaka T, 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, Motoyoshi F (1990) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Citrus* spp from suspension cells. *Jpn J Breed* 40, 199-207
- Hidaka T, Yamada Y, Shichijo T (1979) *In vitro* differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L) Raf. *Jpn J Breed* 29 (3), 248-254
- Iwamasa M, Nishiura M (1982) Recent citrus mutant selections in Japan. In: *Proc Int Soc Citriculture*, November 9-12, 1981, Tokyo, Japan. Okitsu, Japan, Int Soc Citriculture, 1, 96-99
- Iwamasa M, Nito N, Ling JT (1989) Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily, *Aurantioideae*. In: *Proc of the 6th Int Citrus Congress*, Tel Aviv, Israel, March 6-11, 1988. Rehovot, Israel, Balaban, Goren and Mendel, 123-130
- Jacquemond C, Blondel L (1986) Contribution à l'étude des porte-greffes des agrumes : le *Poncirus trifoliata*. 2. Étude du comportement des *Poncirus trifoliata* après greffage. *Fruits* 41, 449-464
- Jarrel DC, Roose ML, Traugh SN, Kupper RS (1992) A genetic map of *Citrus* based on the segregation of isozymes & RFLPs in an intergeneric cross. *Theor Appl Genet* 84, 49-56
- Kobayashi S (1987) Uniformity of plants regenerated from orange (*Citrus sinensis* Osb) protoplasts. *Theor Appl Genet* 74, 10-14
- Kobayashi S, Ieda I, Nakatani M (1982) Role of the primordium cell in nucellar embryogenesis in citrus. In: *Proc Int Soc Citriculture*, November 9-12, 1981, Tokyo, Japan. Okitsu, Japan, Int Soc Citriculture, 1, 44-48
- Kobayashi S, Ohgawara T, Ohgawara E, Oiyama I, Ishii S (1988) A somatic hybrid plant obtained by protoplast fusion between Navel orange (*C sinensis*) and Satsuma mandarin. *Plant Cell, Tissu Org Cult* 14, 63-69
- Kobayashi S, 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, Ben Hayyim G, Spiegel-Roy P, Saad S, Neumann H (1982) Selection of stable salt-tolerant callus cell lines and embryos in *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium*. *Z Pflanzenphysiol* 106, 111-118

- Kochba J, Spiegel-Roy P (1977a) Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of *Citrus*. *HortScience*, 12 (2), 110-114
- Kochba J, Spiegel-Roy P (1977b) The effect of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the « Shamouti » orange (*Citrus sinensis*). *Z Pflanzen physiol* 81, 283-288
- Krug CA (1943) Chromosome numbers in the subfamily *Aurantiodeae* with special reference to the genus *Citrus*. *Bot Gaz* 48, 602-611
- Lucretti S, Chapman JV, Lister A, Giagnacovo G, Migliaccio A, Moretti F, Dolezel J, Starrantino A (1994) Flow cytometric analysis and sorting of *Citrus* protoplasts: A rapid and sensitive technique for selecting somatic hybrids and for measuring the effects of toxins. In: *Proc VII International Citrus Congress*, March 8-13, 1992, Acireale, Italy. Catania, Italy, Int Soc of Citriculture, 1, 329-333
- Luro F (1993) *Utilisation des marqueurs moléculaires pour la cartographie du génome et les études génétiques chez les agrumes*. Bordeaux, France, Université de Bordeaux II, doctorat en sciences, 187 p
- Luro F, Cabasson C, Grosser J, Ollitrault P (1995a) Utilisation des marqueurs RFLP et de la cytométrie en flux pour l'analyse génétique des plantules régénérées après fusion de protoplastes d'agrumes. In: *Symposium sur les mandarines*, San Giuliano, France, mars 1995. San Giuliano, France, INRA/CIRAD ed, p 8
- Luro F, Laigret F, Bove JM, Ollitrault P (1994a) Application of RAPD to citrus genetic and taxonomy. In: *Proc VII International Citrus Congress*, March 8-13, 1992, Acireale, Italy. Catania, Italy, Int Soc of Citriculture, 225-228
- Luro F, Laigret F, Ollitrault P, Bove JM (1995b) DNA Amplified Fingerprinting (DAF), an useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in citrus plant. *HortScience* 30 (5), 1063-1067
- Luro F, Lorieux M, Laigret F, Bové JM, Ollitrault P (1994b) Genetic mapping of an intergeneric citrus hybrid using molecular markers. *Fruits* 49 (5-6), 404-408
- Moore GA (1985) Factors affecting *in vitro* embryogenesis from undeveloped ovules of mature *Citrus* fruit. *J Am Soc Hort Sci* 110 (1), 66-70
- Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, Lawrence SD, Cline K (1992) *Agrobacterium* mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 11, 238-242
- Nachmias AI, Barash I, Solel Z, Srobel GA (1977) Translocation of malsecco toxin in lemon and its effects on electrolyte leakage, transpiration and citrus callus growth. *Phytoparasitica* 5, 94-103
- Navarro L (1982) Citrus shoot-tip grafting *in vitro* (STG) and its applications : a review. In: *Proc Int Soc Citriculture*, November 9-12, 1981, Tokyo, Japan. Okitsu, Japan, Int Soc Citriculture, 1, 452-456
- Navarro L, Ortiz JM, Juarez J (1985) Aberrant citrus plants obtained by somatic embryogenesis of nucelli cultured *in vitro*. *HortScience* 20 (2), 214-215
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ishii S, Yoshinaga K, Oiyama I (1991) Fertile fruit trees obtained by somatic hybridization: Navel orange (*C sinensis*) and Troyer citrange (*C sinensis x Poncirus trifoliata*). *Theor Appl Genet* 81, 141-143
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ohgawara E, Uchimiya H, Ishii S (1985) Somatic hybrids plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theor Appl Genet* 71, 1-4
- Oiyama I, Okudai N, Takahara T (1982) Ploidy level of seedlings obtained from 2x X 4x crosses in citrus. In: *Proc Int Soc Citriculture*, November 9-12, 1981, Tokyo, Japan. Okitsu, Japan, Int Soc Citriculture, 1, 32-34
- Ollitrault P (1992) Somatic embryo grafting; a promising technique for citrus breeding and propagation. *Fruits* 47, 213-218
- Ollitrault P (1994) Research of seedless « willow leaf » mandarin by gamma irradiation of nucellar callus. In: *Proc VII International Citrus Congress*, March 8-13, 1992, Acireale, Italy. Catania, Italy, Int Soc of Citriculture, 113-116
- Ollitrault P, Dambier D, Cabasson C, Teisson C, Luro F (1994a) Protoplast fusion in *Citrus*. *Fruits* 49 (5-6), 401-403
- Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Duperray C (1994b) Nuclear genome size variations in *Citrus*. *Fruits* 49 (5-6), 390-393
- Ollitrault P, Faure X, Normand F (1994c) Citrus rootstocks characterization with bark and leaf isozymes; application for distinguishing nucellar from zygotic trees. In: *Proc VII International Citrus Congress*, March 8-13, 1992, Acireale, Italy. Catania, Italy, Int Soc of Citriculture, 338-341
- Ollitrault P, Jacquemond C (1994) Facultative apomixis, spontaneous polyploidization and inbreeding in *Citrus volkameriana* seedlings. *Fruits* 49 (5-6), 398-400
- Ollitrault P, Luro F, Allent V, Dambier D (1995) Diversification des mandariniers: apport des biotechnologies pour la création de cultivars triploïdes aspermes. In: *Symposium sur les mandarines*, San Giuliano, France, mars 1995. San Giuliano, France, INRA/CIRAD ed, p 6
- Ollitrault P, Michaux-Ferrière N (1994) Application of flow cytometry for *Citrus* genetic and breeding. In: *Proc VII International Citrus Congress*, March 8-13, 1992, Acireale, Italy. Catania, Italy, Int Soc of Citriculture, 193-198
- Ollitrault P, Ollitrault F, Cabasson C (1992) Induction de cals embryogènes d'agrumes par culture d'ovules : détermination isoenzymatique de l'origine tissulaire des embryons. *Fruits* 47, 204-212
- Ollitrault P, Allent V, and Luro F (1996) Obtention of haploid plants and calli of *Citrus reticulata* (Clementine) by induced gynogenesis. In: *VIII Congress of the international society of Citriculture*, 12-17 May 1996. Sun City Resort, South Africa (abstract)

- Perrier X, Ollitrault P, Dubois C (1992) Cartographie du génome et caractères quantitatifs : l'approche biométrique et les contraintes biologiques des agrumes. *Fruits* 47, 135-144
- Rangan TS, Murashige T, Bitters WP (1969) *In vitro* studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. In: *Proc 1st Int Citrus Symp*, 1968, Riverside, États-Unis, Univ California, Chapman, ed, 1, 225-229
- Roose ML (1989) Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in *Citrus* breeding and systematics. In: *Proc of the 6th Int Citrus Congress*, Tel Aviv, Israel, March 6-11, 1988. Rehovot, Israel, Balaban, Goren and Mendel eds, 155-165
- Saito W, Ohgawara T, Shimizu J, Ishii S, Kobayashi S (1993) Citrus cybrid regeneration following cell fusion between nucellar cells and mesophyll cells. *Plant Sci* 88, 195-201
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1991) Freeze preservation of nucellar callus of navel orange (*Citrus sinensis* Osb var *brasiliensis* Tanaka) by a simple and novel method. *Plant Cell Reports* 9, 30-33
- Scora, RW (1989) Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated citrus. In: *Proc of the 6th Int Citrus Congress*, Tel Aviv, Israel, March 6-11, 1988. Rehovot, Israel, Balaban, Goren and Mendel, eds, 277-289
- Soost RK (1987) Breeding citrus genetic and nucellar embryony. In: *Improving vegetatively propagated crops*, (A Abott and R Atkin, eds) London, UK, Academic Press, 83-110
- Soost RK, Cameron JW (1985) Melogold, a triploid pummelo-grapefruit hybrid. *HortScience* 20, 1134-1135
- Soost RK, Williams TE, Torres AM (1980) Identification of nucellar and zygotic seedlings with leaf isozymes. *HortScience* 15, 728-729
- Spiegel-Roy P, Ben Hayim G (1985) Selection and breeding for salt tolerance *in vitro*. *Plant Soil* 89, 243-252
- Starrantino A (1994) Use of triploids for production of seedless cultivars in citrus improvement programs. In: *Proc VII International Citrus Congress*, March 8-13, 1992, Acireale, Italy. Catania, Italy, Int Soc of Citriculture, 117-121
- Starrantino A, Raciti M, Antonelli NM, Tramontano E (1994a) Genetic manipulation of citrus by using the biolistic process. In: *Proc VII International Citrus Congress*, March 8-13, 1992, Acireale, Italy. Catania, Italy, Int Soc of Citriculture, 199-201
- Starrantino A, Recupero G (1982) Citrus hybrids obtained *in vitro* from 2X females by 4X males. In: *Proc Int Soc Citriculture*, November 9-12, 1981, Tokyo, Japan. Okitsu, Japan, Int Soc Citriculture, 1, 31-32
- Starrantino A, Russo F (1980) Seedlings from undeveloped ovules of ripe fruit of polyembryonic citrus cultivars. *HortScience* 15, 296-297
- Starrantino A, Russo F (1983) Reproduction of seedless orange from undeveloped ovules raised *in vitro*. *Acta Horticulturae* 131, 253-258
- Starrantino A, Russo G, Raciti M, Reforgiato Recupero G, Caponnetto P, Lucretti S (1994b) Embryogenic callus formation, protoplast regeneration and somatic fusion of different *Citrus* species. In: *Proc VII International Citrus Congress*, March 8-13, 1992, Acireale, Italy. Catania, Italy, Int Soc of Citriculture, 334-338
- Torres AM, Soost RK, Diedenhofen U (1978) Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. *Am J Bot* 65 (8), 869-881
- Tusa N, Grosser JW, Gmitter FG (1990) Plant regeneration of « Valencia » sweet orange, « Femminello » lemon, and the interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. *J Am Soc Sci* 116, 1043-1046
- Vardi A, Breiman A, Galun E (1987) Citrus cybrids: production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. *Theor Appl Genet* 75, 51-58
- Vardi A, Hutchison DJ, Galun E (1986) A protoplast to tree system in *Microcitrus* based on protoplasts derived from a sustained embryogenic callus. *Plant Cell Reports* 75, 51-58
- Vardi A, 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, Spiegel-Roy P, Galun E (1975) Citrus cell culture isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos. *Plant Sci Let* 4, 231-236
- Vogel R, Bove JM, Nicoli M (1988) Le programme français de sélection sanitaire des agrumes. *Fruits* 43 (12), 709-720
- Weinbaum S, Cohen E, Spiegel-Roy P (1982) Rapid screening of Satsuma mandarin progeny to distinguish nucellar and zygotic seedlings. *HortScience* 17, 239-240
- Whu S, Liang J, Lin Z, Tang X, Zeng S (1986) Using gamma ray to induce mutation for seedlessness in citrus. *Mut Breed Newsl* 27, 14
- Yamamoto M, Kobayashi S, Nakamura Y, Yamada Y (1993) Phylogenetic relations of citrus revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. *Jpn J Breed* 43, 355-365