

UNIVERSITE DE CORSE – PASCAL PAOLI

UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

**AMELIORATION GENETIQUE DES AGRUMES :
Gestion de la diversité et de la ploïdie**

Yann FROELICHER

Soutenue le 29 Juin 2010

devant le Jury composé de :

**Mme Liliane BERTI
M. Yves LESPINASSE
M. Luis NAVARRO
M. Jean-Marc AUDERGON
M. Joseph CASANOVA
M. Felix TOMI**

**Université de Corse, Rapporteur
INRA Angers, Rapporteur
IVIA de Valencia, Rapporteur
INRA Avignon, Examineur
Université de Corse, Examineur
Université de Corse, Examineur**

REMERCIEMENTS

L'innovation variétale est une maladie qui peut se contracter jeune. Alors âgé d'une quinzaine d'année, je tombe sur un article dans la revue « Ca m'intéresse » traitant de l'amélioration des pommiers. Les photos montrent une diversité phénotypique extraordinaire et un chercheur y décrit avec passion son métier d'améliorateur. A la sortie de cet article, je dis à mes parents : «C'est ce métier que je veux faire ». Je n'ai pas retrouvé l'article mais je pense que c'était toi, Yves. Merci !!! Ensuite, la période de latence est longue, Bac, Université d'Orsay, stage obligatoire de Deug. Les cours de biologie végétale et de biotechnologies de George Ducreux et de Jacques De Buyser me passionnent. Bérengère aussi... J'entreprends un stage à l'Inra d'Orléans en Amélioration du Noyer à bois. Pierrette Capelli et Christian Jay-Allemand m'initient à la culture in vitro du Noyer. C'est tellement bien que j'y referai mon stage de DEA. Entre temps, il y a l'armée. On me demande ce que je veux faire plus tard. Réponse : «De l'amélioration des plantes». Résultats : Seconde classe à Chateauroux ! Mais cette maladie les inquiète très rapidement et ils me réforment au bout de trois semaines. A la place, je réalise un stage à l'Inra de Montpellier avec JP Renaudin sur la phosphorylation de la H⁺ATPase du plasmalemma de cellules de tabac en réponse à un traitement auxinique. J'y rencontre Jean-Benoit et Christelle mais c'est trop éloigné de l'amélioration !!!

A la fin de mon DEA, je suis sur le podium mais il n'y a qu'une bourse. Je pars à la recherche d'une bourse. Christian Dumas, codirecteur du stage avec C. Jay Allemand me donne un tuyau, il y a une annonce dans le couloir de Macheix à Montpellier. Là, je découvre une offre délirante : « Un grand groupe industriel, leader dans le secteur des boissons anisées recherche un candidat pour l'étude de la diversité génétique et l'amélioration du genre «Clausena au Cirad en Guadeloupe». Clausena, genre apparenté au Citrus, intéresse ce groupe car une espèce produit beaucoup d'anéthole. Ca me paraît irréel et pourtant je décroche cette bourse. J'apprendrai plus tard que le sujet est parti d'une blague de comptoir entre Patrick Ollitrault et François Luro « Obtenir un pastis en pressant une orange!!! Avant de m'envoler pour la Guadeloupe, je commence par une formation à la technique d'hybridation somatique avec D Dambier. Merci Dom ! Et c'est parti, pour 4 ans au Cirad en Guadeloupe. Je découvre la joie des îles tropicales, la banane, le Ti'punch et surtout le plaisir du travail de chercheur dans l'amélioration d'un genre peu connu « Clausena ». Je rencontre également de nombreux chercheurs et techniciens passionnés et nombreux stagiaires, Claude Vuillaume, Pascale Barantin, Saturnin Bruyère, Nicole Michaux-Ferrière, Jacques Escoutes, Denis Filloux, Christophe Didout, Audrey Guyot Samia Lofty, Frédérique Ollitrault, Pierre-Jean, Franky, Fanny, Olga, Frédéric, Damien, Florent, Luc, Jérôme. La thèse se passe très bien, probablement grâce à un excellent encadrant, Patrick Ollitrault, encore Merci.

La thèse en poche, je réussis à continuer avec le Cirad mais cette fois direction la Corse, avec 3 enfants en plus, Léo, Martin, Emeric. Le quatrième, Grégoire, arrivera l'année d'après. Le démarrage est un peu rude. Merci à toi Thierry Goguey de m'avoir soutenu. Après un peu de ménage, tout rentre dans l'ordre. Je peux enfin me lancer dans l'amélioration des agrumes. Des projets se mettent en place avec mes nouveaux collègues du Cirad Jean Bouffin, Rapahael Morillon, Dominique Dambier, le tout managé par Patrick Ollitrault et Robert Domaingue ainsi qu'avec mes collègues de l'Inra, Francois Luro, Franck Curk, Camille Jaquemond, Isabelle Poggi, Olivier Pailly, Dominique Agostini, Jean-Pierre Thermozy, puis Anne-Laure Fanciulino. Albert Dubois et Geneviève Bernardini m'apportent une aide précieuse dans le quotidien, merci à vous. Je remercie tout le personnel de la station avec qui je partage le quotidien et qui font vivre cette station (Gilles, François V., Simone, Elodie, Jean-Marc, Philippon, Isabelle, Paulette, Sandrine, Florine, Jérémie, Pauline, Victor, Stéphane, Maxime, Jeannine, René, Christian, Jérôme, Mathieu, Josée, Jean-Jacques, Jean-Luc, ...je dois oublier du monde...).

Enfin, un immense merci aux thésards que j'ai encadré, Jean-Baptiste Bassene et Mourad Kamiri et à tous les stagiaires et mains d'oeuvres occasionnelles sans qui ce programme ne serait pas là où il en est : Aissam El Finti, Angélique Angelli, Ange-Toussaint Mattei, Anne-Laure Fanciulino, Audrey Palazzo, Aurélie Rossi, Camille Carcouet, Caroline Belzile, Chjara Luciani, Christine Scotto, Clotilde Pradeau, Emna Jedidi, Fanny LaMilza, Gilles Costantino, Hanh Tran, Jean-Marie Casanova, Josselin Groux, Laeticia Kiyindou, Maria-Jose Montanola, Marie-Christine Roy, Marie-Laure Bianchi, Morgane Aperre, Pauline Kerbirou, Sabrina Casabianca, Sandra Iche, Thibaut Pouillet, Virginie Valliccioni, Wafa Mouhaya.

Pendant cette période, de nombreux partenariats ont été tissés notamment avec :

l'Université de Corse, plus particulièrement avec les laboratoires de biochimie avec Liliane Berti et de chimie avec Joseph Casanova et Félix Tomi,

l'ivia et le laboratoire de biotechnologie avec Luis Navarro, Gemma Ancillo et Pablo Alesa,

l'Université catholique du Chili avec Maria-Jose Montanola et Johanna Martiz.

Notre meilleur allié dans le secteur privé est sans conteste DAK ; merci à Ikbal Srairi, Laila Khouimi, Tarik Kabbage, Bouchra Chaidi.

Un très grand merci à Audrey et Bérengère pour la relecture et la mise en forme de ce mémoire.

Et pour conclure sur ce chapitre, je remercie, l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de participer à cette soutenance, Liliane Berti, Yves Lespinasse, Luis Navarro, Jean-Marc Audergon, Joseph Casanova et Félix Tomi.

Liste des abréviations

ANR : Agence National de Recherche

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

AOX : Oxydase Alternative

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

ABA : acide absicique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique mitochondriale

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomal

siRNA : small interfering RNA

miRNA : microARN

CIRAD : Centre de Coopération Internationale de Recherche Agronomique pour le Développement

CAPS : Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

COV : Certificat d'Obtention Végétal

CMS : Stérilité Mâle Cytoplasmique

CREC : Citrus Research and Education Center

CIV : Culture in vitro

CFGP : Citrus Functional Genomics Project

CAC : citronnier "Apireno Continella"

ESTs : Expressed Sequence Tags

FDR : First Division Restitution

FAO : Food and Agriculture Organization

FISH : Fluorescence in situ Hybridization

GA : Guanine Adenine

GT : Guanine Thymine

GISH (hybridation génomique in situ

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

INRA : Institut National de Recherches Agronomiques

ISSR : Internal Simple Sequence Repeat

IVIA : Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias

LM : limettier "Mexicain"

MSAP : Methylation Sensitive Amplification Polymorphism

NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide
NIRS : Near infrared spectroscopy
PEG : PolyEthylène Glycol
PCR : Polymerase Chain Reaction
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
SSR : Single Sequence Repeat
SCAR : Sequence Characterized Amplified Region
SAM : Sélection Assistée par Marqueurs
SRA : Station de Recherche Agronomique
SDR : Second Division Restitution
SPIR : Spectroscopie Proche InfraRouge
SOD : Superoxyde dismutase
SSCP : Single-Stranded Conformational Polymorphism
TSS : Total Soluble Solids
USDA : United States Departement of Agriculture
UV : Ultra Violet

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	1
1.1. Aire d'origine et histoire de la diffusion des agrumes.....	1
1.2. Taxonomie et diversité génétique.....	2
1.3. Complexité du système de reproduction.....	3
1.4. Niveau de ploïdie des agrumes.....	5
1.5. Importance économique des agrumes.....	5
1.6. Objectifs appliqués d'amélioration des agrumes.....	7
1.7. Objectifs de recherches.....	7
2. STRUCTURATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE CHEZ LES CITRUS	9
2.1. Diversité du génome nucléaire.....	9
2.1.1. Diversité de taille des génomes.....	9
2.1.2. Diversité allélique de marqueurs SSR.....	10
2.2. Diversité du génome chloroplastique.....	11
2.3. Diversité du génome mitochondriale.....	12
2.4. Origine des espèces cultivées.....	12
2.5. Conclusions et perspectives.....	15
3. SELECTION ET AMELIORATION DES AGRUMES	17
3.1. Objectifs d'amélioration des porte-greffes.....	17
3.2. Objectifs d'amélioration des variétés.....	18
3.3. Amélioration des agrumes par recombinaison sexuée.....	19
3.4. La part croissante des biotechnologies en amélioration des agrumes.....	20
3.4.1. La culture <i>in vitro</i> (CIV).....	20
3.4.2. L'embryogenèse somatique.....	20

3.4.3.	L'hybridation somatique.....	20
3.5.	L'aspermie: de la mutation au contrôle génétique.....	23
3.5.1.	La création et la sélection de variétés auto-incompatibles.....	23
3.5.2.	La recherche de mutants stériles.....	24
3.5.3.	La stérilité mitochondriale.....	25
3.5.4.	La recherche de stérilité <i>via</i> la triploïdie.....	25
3.6.	Gestion de la ploidie.....	26
3.6.1.	Obtention d'haploïdes.....	26
3.6.1.1.	Formation d'haploïdes naturels.....	26
3.6.1.2.	Obtention d'haploïdes par gynogenèse induite et androgenèse <i>in vitro</i>	27
3.6.2.	Augmentation du pool de tétraploïdes.....	28
3.6.2.1.	Formation de tétraploïdes spontanés.....	28
3.6.2.2.	Doublement à l'aide d'agent mitoclasique.....	29
3.6.2.3.	Obtention de tétraploïdes par hybridation somatique.....	29
3.6.3.	Obtention de triploïdes dans le programme d'innovation variétale.....	30
3.6.3.1.	Recherche de triploïdes dans les populations diploïdes.....	30
3.6.3.2.	Les croisements diploïde x tétraploïde.....	33
3.6.3.3.	L'hybridation somatique haploïde + diploïde.....	38
3.7.	Conclusions et perspectives.....	39
4.	EXPRESSION GENOMIQUE ET PHENOTYPIQUE CHEZ LES AGRUMES POLYPLOÏDES ET LES CYBRIDES.....	42
4.1.	Les cybrides.....	42
4.1.1.	Les interactions nucléo-cytoplasmiques.....	42
4.1.1.1.	Les interactions noyau-mitochondrie.....	42
4.1.1.2.	Les interactions noyau-chloroplaste.....	43

4.1.2. L'interaction nucléo-cytoplasmique chez les cybrides d'agrumes	43
4.1.2.1. La stérilité mâle cytoplasmique.....	44
4.1.2.2. La résistance aux maladies.....	44
4.1.2.3. La modification phénotypique.....	44
4.1.2.4. Analyse des variations du transcriptome entre le cybride "WLM + EUR" et le citronnier.....	47
4.1.3. Conclusions et perspectives	48
4.2. Les hybrides somatiques tétraploïdes	
4.2.1. Expression phénotypique et génomique chez des tétraploïdes issus d'hybridation somatique	51
4.2.1.1. La polyploïdisation.....	51
4.2.1.2. Les modifications génétiques liées à la polyploïdisation.....	52
4.2.1.3. Les modifications épigénétiques liées à la polyploïdisation...	52
4.2.2. Expression phénotypique et génomique chez les hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes	54
4.2.2.1. Transmission de la morphologie foliaire, florale.....	54
4.2.2.2. Transmission des déterminants de la qualité chez les agrumes.....	56
4.2.2.3. Régulation non additive de l'expression des gènes chez l'hybride somatique tétraploïde citronnier + mandarinier.....	58
4.2.2.4. Expression non additive du transcriptome concordante avec l'absence de codominance pour l'hérédité de nombreux caractères phénotypiques chez les allopolyploïdes.....	60
4.3. Conclusions et perspectives	60
5. CONCLUSIONS GENERALES	62
REFERENCES	

1. INTRODUCTION

1.1. Aire d'origine et histoire de la diffusion des agrumes

Les agrumes représentent une richesse particulièrement importante pour l'humanité, tant du point de vue nutritionnel, qu'économique ou culturel. Depuis plusieurs millénaires, ils ont investi la mode, la religion, la médecine et la vie culinaire avant d'envahir le monde. Les agrumes sont originaires du Sud-Est asiatique. Le principal centre d'origine se situe dans un triangle allant du Nord-Est de l'Inde au Sud-Est de la Chine en descendant jusqu'au centre de l'Australie. Cependant, comme pour tous les végétaux domestiqués par l'homme depuis des siècles, leur origine exacte est difficile à établir avec précision. On suppose qu'avant l'intervention humaine, les pamplemoussiers (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) étaient présents dans l'archipel Malais, les mandariniers (*C. reticulata* Blanco) en Chine tropicale, les cédratiers (*C. medica* L.) et les papédas au Nord-Est de l'Inde (Tanaka 1977) et/ou sur les contreforts sud de l'Himalaya à l'ouest de la Chine (Gmitter et Hu 1990). En revanche, la majorité des espèces appartenant aux genres *Microcitrus* et *Eremocitrus* sont originaires d'Australie et de Nouvelle-Guinée. Ces espèces sont considérées comme proches des *Citrus* mais peuvent évoluer dans un climat plus sec.

La première référence aux agrumes, connue à ce jour, figure dans le livre chinois "Kung Yu" ou "Hommage à Yu", qui cite : « Les paniers ont été remplis avec des soieries tissées d'ornements. L'ensemble contient des oranges et des petits pamplemousses ». L'Empereur chinois Ta Yu, régna de 2205 à 2197 avant JC. Durant la dynastie Chou (1057-256 avant JC), de nombreux ouvrages et poèmes traitent des agrumes. Les mandarines, kumquats et bigarades sont cités pour la première fois durant la dynastie des Han et sont décrits sous forme de prose par Su Hsiang-Ju (mort en 118 avant JC). L'histoire de la propagation des agrumes à partir de l'Asie se lit comme une romance. L'apparence de l'arbre et de ses fruits a toujours attiré l'attention des voyageurs qui les mentionnent dans leurs récits. Ces derniers sont à l'origine de la dispersion des différentes espèces à travers le monde qui a toutefois été très lente. Les agrumes ont commencé leur périple en Asie. Le cédrat est le premier agrume mentionné à l'Ouest de l'Asie par les assyriens dans des écrits sur des tablettes datées de 660 avant JC. Ces fruits ont été acheminés du royaume de Médie (actuel Iran), voisin de l'Assyrie. Selon Gallesio (1811), les juifs ont ramené le cédrat en Palestine lors de leur retour d'exil de Babylone. Le cédrat a été adopté par les juifs

pour la fête du Tabernacle à partir de 136 avant JC. D'après Tolkowsky (1938), de nombreuses plantes telles que le cédratier, le bigaradier, le bergamotier ont été ramenées sur les bords de la Méditerranée lors des conquêtes par Alexandre le Grand en Perse et en Inde en 330 avant JC. Ces agrumes se retrouvèrent ainsi sur de nombreuses mosaïques dans les villas romaines, en particulier à Pompéi. Les autres agrumes arriveront plus tard au grès des invasions arabes (11^{ème} siècle après JC) qui les diffusèrent sur une partie de l'Europe et en Afrique. Les grands navigateurs portugais, espagnols et anglo-hollandais achevèrent cette dispersion entre le 15^{ème} siècle et le 18^{ème} siècle. L'Australie sera le dernier continent à accueillir les agrumes en 1788 en provenance du Brésil.

1.2. Taxonomie et diversité génétique

Les agrumes font partis des *Rutaceae*, l'une des vingt et une familles qui compose l'ordre des Géraniales. Les *Rutaceae* comprennent 1600 espèces et 150 genres regroupés en sept sous-familles et 12 tribus. Les agrumes appartiennent à la sous-famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae*. Le terme "agrumes vrais" selon Swingle et Reece, (1967) regroupe six genres sexuellement compatibles : *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus* (Tableau 1). La majorité des espèces consommées appartiennent au genre *Citrus*. Le genre *Fortunella* rassemble deux à sept espèces respectivement selon Swingle et Reece, (1967) et Tanaka (1977) appelées kumquats. Le genre *Poncirus*, renferme une seule espèce, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., caractérisée par des feuilles caduques, trifoliées et des fruits non comestibles. Il est utilisé comme porte-greffe du fait de ses nombreuses résistances aux contraintes biotiques et abiotiques. Le genre *Microcitrus* comprend six espèces tandis que les genres *Eremocitrus* et *Clymenia* ne contiennent chacun qu'une espèce, respectivement *Eremocitrus glauca* et *Clymenia polyandra*.

La taxonomie et la phylogénie des agrumes, plus particulièrement des *Citrus*, est souvent un sujet de controverse en raison de la forte diversité des caractères phénotypiques (Figure 1), de la fréquence élevée des mutations, d'une longue histoire de culture et d'un système de reproduction complexe (Nicolosi *et al.* 2000). En effet, la présence d'auto-incompatibilité gamétophytique, de l'apomixie facultative, de gènes de stérilité et d'une grande compatibilité sexuelle au sein des différentes espèces de *Citrus* et avec les genres apparentés peuvent être observés. Ainsi, les

génotypes hybrides plus récents, fixés par l'apomixie, sont souvent décrits comme espèces. L'origine asiatique des agrumes est bien établie, mais la phylogéographie à travers l'Asie demeure incertaine. La principale difficulté est l'existence de formes "primitives" d'un même *Citrus* sp. dans différentes localisations comme le cédrat (*C. medica*) dans les forêts d'Assam, en Inde, (Hodgson, 1967 ; Jena *et al.* 2009) et dans le Yunnan, en Chine, (Gmitter et Hu 1990). De nombreuses classifications ont été établies au sein du genre *Citrus* mais celles de Swingle et Reece (1967) et Tanaka (1977) sont les plus utilisées. Ces auteurs ont des visions différentes en ce qui concerne la classification des espèces ; ainsi la classification de Swingle identifie seize espèces, là où celle de Tanaka en décrit 162. Récemment, Mabberley (1998, 2004), Zang et Mabberley (2008) ont tenté de réviser ces classifications en s'appuyant sur les avancées des généticiens et de la phylogénie moléculaire. Ils ont réintégré les espèces appartenant aux genres *Poncirus* et *Fortunella* au sein du genre *Citrus*. Ainsi, *Poncirus trifoliata* devient *Citrus trifoliata* tandis que les espèces appartenant au genre *Fortunella* sont regroupées sous l'espèce *Citrus japonica*. Ces espèces sont sexuellement compatibles avec le genre *Citrus* et donnent des hybrides fertiles. Il peut donc paraître logique de réintégrer ces espèces au sein du genre *Citrus*. En revanche, les modifications proposées au sein des espèces du genre *Citrus* par Zhang et Mabberley (2008) sont beaucoup plus hasardeuses. Ainsi, le genre *Citrus* ne comprendrait plus que sept espèces de base et quatre taxa hybrides qui regroupent de nombreux génotypes élevés au rang d'espèce selon Tanaka (1977) et Swingle et Reece (1967).

1.3. Complexité du système de reproduction

Les fleurs, chez les agrumes, sont hermaphrodites (Figure 2). La présence d'un disque nectarifère à la base des filets est une des caractéristiques de la famille des *Rutaceae*. Les fleurs sont généralement blanches, mais peuvent être légèrement pourpres chez les cédratiers et leurs hybrides. Le calice est constitué de trois à cinq sépales et la corolle de quatre à huit pétales. La floraison a lieu au printemps en climat méditerranéen et elle est relativement groupée. Toutefois, les *Poncirus* fleurissent un mois avant les *Citrus* tandis que les kumquats, un mois après. En climat tropical humide, la floraison peut être remontante. La pollinisation est de type entomophile. Le système de reproduction des agrumes se caractérise par une grande diversité de comportements et une certaine complexité. La majorité des espèces sont fertiles mais il existe des cas de stérilité (Iwamasa 1966). Cette stérilité peut affecter aussi bien les pièces mâles que les

pièces femelles de la fleur. Les mandariniers "Satsuma", le pomelo "Marsh" présentent des stérilités femelles marquées tandis que les orangers "Navel" présentent des stérilités mâles et femelles. La stérilité gamétique peut être due à des facteurs génétiques comme la triploïdie, des stérilités géniques ou des aberrations chromosomiques (translocation réciproque chez l'oranger "Valencia", inversion chez le limettier "Mexicain") (Yamamoto *et al.* 1997), ou à des facteurs environnementaux comme les basses températures (Iwamasa 1966).

L'auto-incompatibilité gamétophytique est relativement répandue chez les agrumes (Soost 1969). Les pamplemoussiers (*Citrus maxima*) ont été décrits comme étant totalement auto-incompatibles ainsi que quelques hybrides de mandariniers tels que le clémentinier (*Citrus reticulata* x *C. sinensis*), les tangelos (*Citrus reticulata* x *C. paradisi*) "Minneola", "Orlando" et "Robinson" (Soost 1965; Soost 1969). L'auto-incompatibilité limite la consanguinité au cours de l'évolution mais elle est gênante pour la réalisation de lignées partiellement homozygotes.

Combinées à la parthénocarpie, la stérilité et l'incompatibilité gamétophytique conduisent à la production de fruits sans pépin. De nombreuses variétés commerciales doivent leur intérêt à leur auto-incompatibilité.

La polyembryonnie ou apomixie partielle, constitue la plus grande originalité des agrumes. Elle est présente chez de nombreux génotypes. Seules deux espèces, les cédratiers (*Citrus medica*) et les pamplemoussiers (*Citrus maxima*), ainsi que quelques variétés de mandariniers telles que le clémentinier et les mandariniers "Wilking", "Fortune", "Ellendale" sont monoembryonnées (Swingle et Reece, 1967). La polyembryonnie se caractérise généralement par la présence de plusieurs embryons au sein d'une même graine. Ces embryons peuvent être d'origine zygotique, ou somatique issus des cellules du nucelle (Iglesias *et al.* 1974; Iwamasa *et al.* 1967; Torres *et al.* 1982). Les embryons nucellaires possèdent le même génotype que la femelle conduisant à de la reproduction clonale, tandis que le génome de l'embryon zygotique est issu du croisement des génomes parentaux. La polyembryonnie a joué un rôle essentiel dans l'évolution des agrumes. Elle a permis la fixation de génotypes et leurs propagations de manière quasi conforme, aux mutations près. Cette multiplication conforme à partir de semis est particulièrement intéressante pour la production de porte-greffes. En revanche, elle constitue un obstacle important pour les programmes d'amélioration génétique en réduisant les chances d'obtention d'hybrides.

1.4. Niveau de ploïdie des agrumes

La quasi-totalité des agrumes sont diploïdes ($2n = 2x = 18$) (Krug 1943). Le nombre de chromosomes de base est $n = 9$ chez tous les agrumes et chez les genres apparentés (Krug 1943). Au sein du genre *Citrus*, l'existence de polyploïdes est connue mais pas courante (Cameron et Soost 1969; Esen et Soost 1973; Krug et Bacchi 1943). Des polyploïdes, majoritairement des triploïdes ou des tétraploïdes, peuvent apparaître spontanément ou bien après certains croisements (Esen et Soost 1973; Hutchinson et Barrett 1981). Des génotypes polyploïdes naturels ont été identifiés tels que le limettier "Tahiti" (triploïde) et *Fortunella hindsii* (tétraploïde). Les polyploïdes semblent avoir joué un rôle peu important dans l'évolution des agrumes. Les tétraploïdes sont généralement le résultat d'un doublement chromosomique des embryons nucellaires et sont moins vigoureux que les diploïdes (Cameron et Frost 1968). Les tétraploïdes présentent peu d'intérêts pour l'utilisation directe en production par leur faible rendement et leur peau plus épaisse (Cameron et Frost 1968; Soost et Cameron 1975). D'autres différences sont observées entre tétraploïdes et diploïdes telles qu'une épaisseur foliaire supérieure et une taille cellulaire plus importante. Dans les semis de graines polyembryonnées, la fréquence des tétraploïdes spontanés varie généralement de 1% à 3%, pouvant dans de rares cas être nettement supérieure (Barrett et Hutchison 1978). Elle est sous contrôle génétique mais peut être modifiée par des facteurs physiologiques et environnementaux. Les triploïdes peuvent résulter de croisements entre diploïdes et tétraploïdes ou bien de la fécondation d'un gamète non réduit ($2n$ gamètes) avec un gamète normal. Ces cultivars triploïdes sont généralement stériles ou alors très peu fertiles (Ramsey et Schemske 1998). Chez les *Aurantioideae*, deux espèces tétraploïdes naturelles ont été décrites dans le genre *Clausena*, *C. harmandiana* et *C. excavata* (Froelicher 1999; Froelicher et Ollitrault 1998).

1.5. Importance économique des agrumes

Les agrumes représentent la première production fruitière mondiale, avec 117 millions de tonnes en 2007 (FAO, 2009). Cette production n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies. Les principaux producteurs sont le Brésil (20,6 MT), le bassin méditerranéen (20 MT), la Chine (19,6 MT) et les USA (10 MT). L'orange représente une très large part de la production

mondiale d'agrumes (55,2 %), suivie du groupe des petits fruits d'épluchage facile (mandarines, et clémentines: 23 %), des citrons et des limes (11,2 %), des pomelos et des pamplemousses (4,4 %), et les autres variétés (6,2 %) (FAOSTAT. 2009). Environ 70% de la production est destinée au marché du fruit frais et 30% est transformée en jus, composée essentiellement d'oranges. Une infime partie de la production est également utilisée pour la fabrication d'huiles essentielles (alimentation et parfumerie), ainsi que pour les plantes d'ornement. Riches en vitamine C, mais aussi en fibres, minéraux, et autres anti-oxydants tels que les caroténoïdes et les flavonoïdes, les agrumes ont un effet bénéfique pour la santé (Manach *et al.* 2003; Scalbert et Williamson 2000). Dans le bassin méditerranéen, la majorité de la production est destinée au marché du fruit frais contrairement aux USA et au Brésil où elle est vouée à la transformation. La clémentine et les hybrides de mandarines sont les produits phares de la zone méditerranéenne, la plaçant au rang de premier producteur mondial pour ce type de fruit. La demande du marché pour ce type de fruit est particulièrement soutenue, passant de 18,3 millions de tonnes à 27,9 millions de tonnes entre 2000 et 2007 (FAOSTAT 2009). La clémentine constitue également une filière agricole importante, à l'échelle de la région Corse avec une production oscillant entre 17000 et 25000 tonnes par an. L'aspermie est l'une des caractéristiques les plus importantes pour les mandarines sur le marché des fruits frais, car les consommateurs acceptent de moins en moins les pépins dans les fruits. La quasi totalité des variétés de mandariniers (dont le clémentinier) cultivées dans le bassin méditerranéen sont auto-incompatibles. Lorsqu'elles sont cultivées en bloc monoclinal, elles produisent des fruits sans pépin. En revanche, la présence de génotypes différents et fertiles, dans un environnement proche, entraîne la présence de pépins dans les fruits, dépréciant fortement la qualité. La compétitivité sur les marchés internationaux des petits fruits est en forte augmentation. De plus, les variétés précoces et tardives sont de piètres qualités. La poursuite du succès des petits fruits type mandarine passe par le développement de nouvelles variétés répondant aux attentes des producteurs et des consommateurs. Pour le marché du fruit frais occidental, la qualité du produit et sa disponibilité tout au long de l'année sont devenus des critères essentiels. Pour les pays du sud, des fruits frais de gros calibre avec de fortes teneurs en sucre et peu d'acidité sont très attendus.

1.6. Objectifs appliqués d'amélioration des agrumes

Le projet d'amélioration des agrumes que nous conduisons en Corse, dans la gamme petit fruit d'épluchage facile, tend à répondre à différents objectifs. Le premier vise à créer, sélectionner et proposer au marché des nouvelles variétés apyrènes de hautes valeurs organoleptiques et nutritionnelles. Le second objectif tend à développer une gamme variétale afin de segmenter le marché en proposant des produits sur six mois de l'année. Enfin, le troisième consiste à sélectionner du matériel végétal spécifique pour la Corse, où le Cirad est présent, au sein de la station Inra mais également pour le bassin méditerranéen et la zone tropicale humide. En effet, par son mandat, le Cirad se doit, au travers de partenariat, de contribuer au développement économique et social des régions chaudes par de la formation et au travers de ses recherches et ses innovations.

Afin de tendre vers ces objectifs finalisés, il est nécessaire de bien connaître ses ressources génétiques, ce qui soulève un certain nombre de questions de recherche plus cognitive.

1.7. Objectifs de recherches

Les agrumes reposent sur un système de reproduction complexe, comportant de la reproduction sexuée, de l'apomixie, un système d'auto-incompatibilité gamétophytique et des gènes de stérilité nucléaire et cytoplasmique. Cette grande complexité est généralement associée à des écarts importants aux règles du mendélisme, de forts taux d'hétérozygoties fixés par l'apomixie, des accumulations de mutations et une forte structuration autour du complexe d'espèces. Certains agrumes cultivés aujourd'hui peuvent être le résultat de sélections très anciennes ayant alors accumulés de nombreuses mutations, maintenues par la multiplication végétative. De plus, même si les agrumes sont considérés comme étant majoritairement diploïdes, des variations du niveau de ploïdie sont fréquemment observées dans les semis chez de nombreuses variétés.

La base du travail de l'améliorateur repose sur une parfaite connaissance de ces ressources génétique. Le premier objectif de notre projet consiste à étudier la structuration de la diversité génétique et l'origine des espèces cultivées afin d'avoir une gestion raisonnée de l'hétérozygotie et des schémas de création.

Ces dernières années, le développement des biotechnologies, en particulier de la biologie cellulaire et de la biologie moléculaire, a donné de nouveaux outils à l'améliorateur. Le développement de techniques de biologie cellulaire a permis de mieux manipuler la ploïdie chez les agrumes, débouchant sur l'obtention d'hybrides somatiques, des cybrides, des plantes haploïdes et polyploïdes....Le deuxième objectif consiste à développer de nouvelles méthodes originales de création et à étudier les spécificités génétiques du matériel créé.

Aujourd'hui, ce matériel est devenu l'objet de recherches appliquées pour la création de matériel sans pépin, et de recherches cognitives, en particulier sur la transmission des caractères impliqués dans la qualité des fruits, chez les hybrides somatiques et les cybrides. Il soulève ainsi de nouvelles questions de recherche sur l'expression du génome et l'hérédité des caractères chez les hybrides somatiques d'agrumes.

Les génomes cytoplasmiques ont-ils un impact sur la régulation de l'expression du génome nucléaire et sur l'expression phénotypique, en particulier sur les caractéristiques déterminant la qualité du fruit ?

Quelle est l'expression phénotypique et génomique chez les hybrides somatiques allotétraploïdes ?

Ce mémoire se divise en trois chapitres. Le premier traite des travaux effectués sur la diversité génétiques chez les agrumes. Le second récapitule les avancés effectuées dans le domaine de la création et la sélection variétale. Enfin, le dernier aborde les travaux effectués sur l'expression phénotypique et génotypique chez un hybride somatique et les interactions nucléo-cytoplasmiques chez un cybride.

2. STRUCTURATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE CHEZ LES CITRUS

Comprendre la taxonomie, les relations phylogénétiques et la variabilité génétique chez les agrumes est essentielle pour déterminer les rapports génétiques, la caractérisation du germoplasme, le contrôle de l'érosion génétique, la conception des stratégies d'échantillonnage ou de collections de base (core collection) et la mise en place des programmes d'amélioration (Herrero *et al.* 1996). La taxonomie des agrumes est assez confuse et controversée, en raison d'une grande compatibilité sexuelle, de la fréquence élevée des mutations, d'un long passé de culture et de dispersion. De nouveaux génotypes hybrides, fixés par l'apomixie, sont souvent décrits comme espèces. De nombreuses études réalisées à l'aide de marqueurs moléculaires nucléaires et cytoplasmiques, conduites par le Cirad, l'Inra et de nombreuses équipes internationales ont permis de mieux comprendre la diversité génétique présente chez les agrumes, leur structuration et l'origine des espèces cultivées dans le genre *Citrus*.

2.1. Diversité du génome nucléaire

2.1.1. Diversité de taille des génomes

La cytogénétique (Guerra 1984), puis l'avènement de la cytométrie en flux, ont permis d'évaluer la taille des génomes de différentes espèces du genre *Citrus* et d'espèces apparentées. Les premiers travaux de cytométrie en flux chez les agrumes ont été publiés par Ollitrault et Michaux-Ferrière (1992). Les génomes 2C des *Citrus* et des espèces apparentées sont relativement petits. Ils sont compris entre 0,70 pg et 0,81 pg ce qui ne représente que trois fois le génome d'*Arabidopsis* (Froelicher 1999; Ollitrault *et al.* 1994). Parmi les espèces du genre *Citrus*, les génomes de *C. reticulata* (mandariniers) sont les plus petits, tandis que les génomes de *C. medica* (cédratiers) sont les plus grands (Tableau 2). Les tailles des autres espèces se trouvent comprise entre ces deux extrêmes (Ollitrault *et al.* 1999). Les génomes des genres apparentés au *Citrus* (*Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Eremocitrus*) présentent toutefois une taille très voisine de celle des *Citrus*. Seules les tailles des génomes de *Severinia buxifolia* et de *Citropsis gilletiana* sont très différentes. Ces espèces présentent des incompatibilités d'hybridation avec le genre *Citrus* (Iwamasa *et al.* 1988). Toutefois, la taille du génome de *Clausena anisum olens*,

bien que similaire à celle des *Citrus*, présente des incompatibilités d'hybridation (Froelicher 1999).

2.1.2. Diversité allélique de marqueurs SSR

Afin d'étudier la diversité génétique intra et interspécifique et la structuration du genre *Citrus* et du genre *Clausena*, le Cirad, Pernod-Ricard et l'Inra se sont associés dans le cadre d'un projet Génoscope pour définir de nouveaux marqueurs microsatellites de type SSR. Ces marqueurs ont été développés à partir d'une banque d'ADN génomique enrichie en motifs dinucléotidiques GA et GT de mandariniers "Cléopâtre" (Froelicher *et al.* 2008). Une première étude portant sur 60 génotypes représentatifs de la diversité génétique du genre *Citrus* et des genres apparentés a été réalisée avec 48 marqueurs SSR. 574 allèles ont été ainsi identifiés parmi ces 48 loci. Ces marqueurs permettent de différencier toutes les espèces les unes des autres. Toutefois, la diversité intraspécifique observée pour les espèces apparaît très contrastée. En effet, aucun polymorphisme n'a été détecté au sein des espèces d'orangers (*C. sinensis*), de pomelos (*C. paradisi*), de bigaradiers (*C. aurantium*), de citronniers (*C. limon*). Pourtant, ces espèces présentent une hétérozygotie relativement importante tout en présentant une diversité allélique nulle au niveau intravariétale. Ces espèces, après le processus d'hybridation, ont évolué par accumulation de mutations, rendues possible par l'apomixie. Chez les autres espèces, la diversité allélique ainsi que le niveau d'hétérozygotie sont variables. Chez les cédratiers, les deux sont relativement faibles. En revanche, les pamplemoussiers présentent une diversité allélique importante et une forte hétérozygotie. Concernant le groupe des mandariniers, une seconde étude plus large, portant sur 29-26 mandariniers, a été entreprise à l'aide de 43 marqueurs microsatellites de type SSR. Ainsi, au sein du groupe des mandariniers, la diversité allélique est relativement importante. Parmi les 29-26 mandariniers étudiés à l'aide 43 marqueurs, 200 allèles différents ont été identifiés. L'hétérozygotie moyenne est de 0.45 (Froelicher *et al.* 2008). Il est intéressant de noter que les pamplemoussiers et les mandariniers présentent un brassage génétique important tout en possédant un système de reproduction différent. Les premiers sont monoembryonnés et auto-incompatibles tandis que les seconds sont polyembryonnés (très majoritairement) et plutôt auto-compatibles.

Une forte structuration génétique est observée sur la base des 48 marqueurs SSR chez les 34 espèces appartenant au genre *Citrus* (Figure 3). La diversité des *Citrus* cultivés se répartit autour de trois groupes, les mandariniers/orangers, les pamplemoussiers/pomelos/bigaradiers et les cédratiers. Ce dernier présente un apparentement marqué avec les limettiers et les citronniers. Ces résultats sont en accord avec l'étude obtenue sur la base de marqueurs enzymatiques (Ollitrault *et al.* 1999). Toutefois, l'échantillonnage effectué à partir de la collection Inra/Cirad sous-représente le groupe des papedas. Ainsi, Nicolosi *et al.* (2000), montre qu'il y aurait 4 taxons de base à l'origine des espèces cultivées : papedas, mandariniers, pamplemoussiers et cédratiers.

2.2. Diversité du génome chloroplastique

Afin d'analyser la diversité chloroplastique sur un échantillonnage de quarante-quatre génotypes appartenant au genre *Citrus* et apparentés, nous avons réalisé une étude à l'aide de cinq amorces universelles définies par Demesure *et al.* (1995)(Demesure *et al.* 1995), couplées chacune à deux ou trois enzymes de restriction (Froelicher *et al.* 2000). Les onze marqueurs CAPS (Cleaved Amplified Polymorphisms), préalablement sélectionnés pour leur polymorphisme, confirment une forte différenciation des taxons pamplemoussiers, cédratiers et mandariniers, structurant la diversité nucléaire au sein du genre *Citrus* (Figure 4). Il est important de noter que *C. micrantha* et les papedas sont absents de cette étude. Ce type de marqueurs apporte également des informations sur l'origine maternelle des génotypes. En effet, les chloroplastes possèdent une hérédité maternelle chez les *Citrus* (Moreira *et al.* 2002). Ainsi, les orangers et pomelos présentent des marqueurs chloroplastiques identiques à ceux des pamplemoussiers. Les citronniers et bigaradiers ne se distinguent que par un marqueur des trois génotypes précédents. Ces résultats ont été confirmés par des études de phylogénie moléculaire réalisées à l'aide de marqueurs CAPS chloroplastiques (Nicolosi *et al.* 2000), SSR chloroplastiques (Cheng *et al.* 2005) ou de neuf séquences d'ADN chloroplastiques (Bayer *et al.* 2009). Ils mettent cependant en évidence, l'existence d'un quatrième taxon de base constitué des papedas.

En utilisant le même type de marqueurs CAPS, un plus grand polymorphisme a été observé au sein du génome chloroplastique comparativement aux génomes mitochondriaux du genre *Citrus* (Lotfy *et al.* 2003).

2.3. Diversité du génome mitochondrial

Chez les agrumes, très peu de marqueurs mitochondriaux polymorphes sont disponibles pour étudier la diversité génétique et la phylogénie moléculaire. Afin de trouver de nouveaux marqueurs, quarante-quatre marqueurs universels précédemment définis par Dumolin-Lapegue *et al.* (1997) et Duminil *et al.* (2002) ont été testés chez les agrumes mais un seul a révélé du polymorphisme. A partir des séquences d'ADN mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana* et *Beta vulgaris*, six couples d'amorces ont été définis dans des régions conservées et ont amplifié des régions moins conservées telles que les régions intergéniques et introniques. Trois paires d'amorces, définies dans des gènes codant pour la NADH déshydrogénase sous-unités 2, 5 et 7, ont révélé du polymorphisme chez les agrumes (Froelicher *et al.* accepté). Dans un premier temps, nous avons confirmé que les agrumes ont une hérédité mitochondriale maternelle à partir de deux populations de 250 et 120 individus. Ce résultat est en accord avec ceux de Green *et al.* (1986) et Yamamoto *et al.* (1993). Cependant, Moreira *et al.* (2002) ont observé une hérédité biparentale. En utilisant les quatre amorces polymorphes sur soixante-dix-sept génotypes représentant la diversité des agrumes et de deux genres apparentés, sept mitotypes ont été identifiés (Figures 5-6). Six mitotypes (*Poncirus*, *Fortunella*, *Citrus medica*, *C. micrantha*, *C. reticulata* et *C. maxima*) sont en accords avec les études taxonomiques précédentes. Le septième mitotype permet de distinguer un groupe de mandariniers acides ("Cléopâtre", "Sunki" et "Shekwasha"), des autres mandariniers doux (Froelicher *et al.*, accepté) (Figure 5).

2.4. Origine des espèces cultivées

A partir de données phénotypiques, Scora (1975) et Barrett et Rhodes (1976) suggèrent qu'il y a seulement trois taxons de base chez les agrumes, les cédratiers (*C. medica* L.), les mandariniers (*C. reticulata* Blanco) et les pamplemoussiers (*C. maxima* (Burm.) Merr.). L'étude de taxonomie numérique de Barrett et Rhodes (1976) a été réalisée sur quarante-trois génotypes. Ces auteurs sont les premiers à suggérer que les autres espèces sont issues d'hybridations entre ces espèces « vraies ». Depuis, de nombreux marqueurs nucléaires biochimiques et moléculaires ont été développés pour étudier la diversité génétique et la phylogénie des agrumes des genres et des espèces, tels que les isoenzymes (Torres *et al.* 1978; Herrero *et al.* 1996), RFLP (Federici *et*

al. 1998), RAPD (Nicolosi *et al.* 2000; Corazza-Nunes, 2002; Nicolosi *et al.* 2005), ISSR (Fang *et al.* 1998; Gulsen et Roose 2001), SSR (Barkley *et al.* 2006; Froelicher *et al.* 2008; Luro *et al.* 2008; Corazza-Nunes *et al.* 2002). Les études réalisées avec ces marqueurs moléculaires confirment les résultats de Barrett et Rhodes (1976). Toutefois Federicci *et al.*, (1998) suggèrent l'existence d'un quatrième taxon de base comprenant les papedas. Ce résultat a été confirmé par diverses études utilisant des marqueurs de l'ADN cytoplasmique (Froelicher *et al.* accepté; Nicolosi *et al.* 2000). *C. micrantha* pourrait être le représentant de ce groupe des papedas en tant qu'espèce la plus primitive (Hodgson 1967; Nicolosi *et al.* 2000).

Ainsi, quatre taxons de base seraient à l'origine de l'ensemble des espèces cultivées (Nicolosi *et al.* 2000). Les autres espèces seraient apparues par recombinaisons entre ces taxons de base après avoir été mises en contact par l'homme lors des échanges commerciaux et des grandes invasions. Ainsi, les principales espèces commerciales que sont les orangers, les pomelos, les citronniers, les limettiers, les bigaradiers et les clémentiniers seraient en fait des hybrides plus ou moins directs entre les taxons de base et qui ont été élevés au rang d'espèce par certains taxonomistes. Les études réalisées à l'aide de marqueurs biochimiques et moléculaires ont montré, généralement, que ces espèces présentaient une hétérozygotie très élevée. En revanche au sein de ces espèces, on constate une quasi-absence de polymorphisme (Ollitrault *et al.* 1999); c'est le cas pour les orangers, les pomelos, les citronniers, les bigaradiers et les clémentiniers. Ces espèces seraient donc des hybrides, probablement fixés par l'apomixie ou la multiplication végétative et qui se seraient diversifiés phénotypiquement par accumulation de mutations. Les marqueurs moléculaires nucléaires permettent d'identifier les origines parentales dans certains cas en particulier lorsque ces hybridations ont eu lieu récemment. En effet, (Green *et al.* 1986; Yamamoto *et al.* 1993) ont montré que les chloroplastes et les mitochondries sont transmis par la mère.

Ainsi le clémentinier, connu pour être issu d'un semis de mandarinier "Willow Leaf" effectué par le père Clément il y a plus d'un siècle (Trabut 1902) et élevé au rang d'espèce *C. clementina* par Tanaka, serait un hybride de mandarinier x oranger (Nicolosi *et al.* 2000).

Les orangers, bigaradiers et pomelos possèdent des allèles de mandariniers et de pamplemoussiers et tous ont pour origine maternelle le pamplemoussier. Les orangers et bigaradiers pourraient être des hybrides pamplemoussier x mandarinier (Nicolosi *et al.* 2000). Pour Barkley *et al.* (2006); Federici *et al.* (1998); Nicolosi *et al.* (2000), les orangers seraient plus

proches des mandariniers tandis que les bigaradiers seraient plus proches des pamplemoussiers, ce qui laisse supposer qu'ils pourraient être issus de croisements réciproques.

Les pomelos sont très proches des pamplemoussiers. Ils pourraient résulter d'une hybridation entre des pamplemoussiers et les orangers lorsqu'ils ont été introduits dans les Caraïbes par C. Colomb en 1493 (Webber 1948).

L'origine des citronniers et des limettiers est plus complexe et probablement multiple. En revanche, il est maintenant bien établi qu'ils sont le résultat d'une diversification secondaire (Scora, 1975; Barkley *et al.*, 2006; Nicolosi *et al.* 2000). Leur taxonomie est encore controversée et même les noms communs "lime" et "citron" n'ont pas de correspondance avec la taxonomie des *Citrus*. Ils possèdent comme caractéristiques communes des allèles de cédratiers ainsi que des caractères phénotypiques tels que l'acidité et la couleur jaune. Ainsi, l'apparement des cédratiers, des limettiers et des citronniers est clairement établi par l'analyse de la diversité allélique et des caractères morphologiques. De plus, les citronniers possèdent des allèles de mandariniers et de pamplemoussiers. La synthèse des données chloroplastiques et nucléaires indique que les mandariniers et pamplemoussiers ont également contribué à l'apparition des citronniers. Nicolosi *et al.* (2000) proposent ainsi que cette espèce pourrait résulter d'une hybridation entre bigaradier (lui même hybride pamplemoussier x mandarinier) et cédratier.

Chez les limettiers, Hodgson (1967) distingue deux catégories, ceux à gros fruits et ceux à petits fruits. Le limettier à petits fruits, *C. aurantifolia* type "Mexicain", est la seule espèce pour laquelle un taxon extérieur à ceux étudiés précédemment, est intervenu ; il possède en effet un génome chloroplastique très différent de celui des autres espèces cultivées du genre *Citrus*. Les travaux réalisés par Nicolosi *et al.* (2000) suggèrent ainsi que le limettier "Mexicain" (*C. aurantifolia*) serait issu d'une hybridation entre le cédratier et *C. micrantha*. Ces résultats sont confirmés par nos analyses des génomes mitochondriaux (Froelicher *et al.* accepté). Les limettiers à gros fruits *C. aurantifolia* (classification de Swingle), *C. latifolia* (classification de Tanaka) de type "Tahiti" ou "Bears", mais également les limes douces *C. limettioides* "Palestine", "Brazilian" et les limettes type "Marrakech" possèdent tous un cytoplasme ayant pour origine les pamplemoussiers. Pour Nicolosi *et al.* (2000), les limes douces seraient le résultat de croisement entre bigaradier et cédratier tandis que pour Bayer *et al.* (2009) la lime "Tahiti" serait le produit d'un croisement entre citronnier (*C. limon* ?) et limettier "Mexicain" (*C. aurantifolia*).

Enfin, il y a les citronniers et limettiers utilisés en tant que porte-greffes tels que le limettier "Rangpur" ou les citronniers "Volkameriana" et "Rough". Les trois sont désignés par Swingle et Reece (1967) comme *C. limon* tandis que Tanaka (1977) les élève au rang d'espèces *C. limonia* (Volkameriana et Rangure) et *C. jambhiri* (Rough). Scora (1975) suggère que le citron "Rough" est un hybride naturel entre un mandarinier et un cédratier. Sur la base de RAPD, SCAR et ISSR, Nicolosi *et al.* (2000) et Barkley *et al.* (2006) proposent également le cédratier et le mandarinier comme ancêtres du citron "Rough" et du limettier "Rangpur", mais ces génotypes ne peuvent pas être considérés comme des hybrides directs. Le citronnier "Volkameriana" a des origines plus complexes. Dans un précédent travail, Deng *et al.* (1996) ont proposé qu'il pourrait être un hybride entre le cédratier et le bigaradier. Nicolosi *et al.* (2000) ont confirmé cette hypothèse mais probablement après un rétrocroisement avec le mandarinier. Barkley *et al.* (2006) ont estimé que "Volkameriana" pourrait être un mélange entre le cédratier, mandarinier et pamplemoussier mais que la majorité de ses allèles proviennent du cédratier et du mandarinier. Le développement de nouveaux marqueurs moléculaires mitochondriaux a permis de distinguer deux groupes parmi les mandariniers : les mandariniers acides type "Cléopâtre"/"Sunki" probablement originaires d'Inde ou de l'Ouest de la Chine, classiquement utilisés comme porte-greffes et les mandariniers doux originaires du sud de la Chine. Ainsi, nos données suggèrent que le groupe mandarinier acide type "Cléopâtre"/"Sunki" a transmis son cytoplasme dans la genèse de "Rangpur" et "Rough" (Froelicher *et al.* accepté). Tous ces génotypes sont originaires des contreforts de l'Himalaya coté Indien (Hodgson 1967) ou Chinois (Gmitter et Hu 1990).

2.5. Conclusions et perspectives

Le développement de marqueurs moléculaires nucléaires, chloroplastiques et mitochondriaux ont permis d'étudier la diversité génétique et l'origine des agrumes cultivés. Il ressort que quatre taxons de base (*C. reticulata*, *C. maxima*, *C. medica* et *C. micrantha*) sont à l'origine de l'ensemble des espèces cultivées. Les grands événements à l'origine des formes cultivées sont relativement bien connus. Ces agrumes cultivés, aujourd'hui considérés comme des espèces dites secondaires (*C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. limon*, *C. aurantium*, *C. aurantifolia*), résultent d'un nombre limité d'événements de méioses et de croisements interspécifiques. En

revanche, la structure génomique fine des espèces secondaires, constituée par recombinaison entre les taxons ancestraux n'est pas connue.

L'arrivée prochaine de la séquence complète d'un génome de clémentinier, travail réalisé dans le cadre du Consortium international de génomique des agrumes et du projet ANR Citrusseq, ainsi que le développement des plateformes de séquençage à haut débit vont permettre d'acquérir de plus amples connaissances sur la structure des variétés cultivées d'agrumes. Pour l'établissement de cette séquence, le consortium a privilégié le choix d'une séquence simple, un haploïde de clémentinier plutôt qu'un génome diploïde d'oranger. En effet, les premiers travaux de séquençage réalisés sur ce dernier, ont révélé des difficultés liées au fort niveau d'hétérozygotie. Cette première séquence devrait servir de modèle pour des projets de reséquençages des représentants des taxons ancestraux et des espèces secondaires. Ainsi, des études de diversité à partir des séquences d'un certain nombre de gènes d'intérêts pourront être rapidement établies. Dans un futur de cinq à dix ans, on peut tout à fait imaginer disposer des séquences complètes des différents représentants des taxons ancestraux et des espèces secondaires. Ce travail devrait donner des informations sur la structure génomique fine des espèces secondaires. Couplé à un travail de phénotypage, ces technologies devraient également contribuer au développement de marqueurs qui augmenteraient l'efficacité des projets d'amélioration traditionnelle (SAM, sélection assistée par marqueurs).

3. SELECTION ET AMELIORATION DES AGRUMES

Depuis plusieurs millénaires, les agrumes sont consommés, sélectionnés, multipliés et propagés par l'homme. De nombreuses variétés cultivées, aujourd'hui à travers le monde, sont issues de sélections d'hybrides spontanés ou de sélections clonales de mutations spontanées identifiées dans les vergers. A la fin du 19^{ème} siècle, les premiers programmes d'amélioration par hybridation sexuée sur les agrumes ont débuté aux Etats-Unis avec pour objectif principal de conférer une meilleure résistance au froid aux orangers. Les objectifs de l'amélioration se sont depuis fortement diversifiés du fait d'une plus grande exigence des producteurs et des consommateurs, mais également du fait de l'apparition de nombreuses contraintes biotiques et abiotiques. Ces objectifs varient considérablement en fonction des besoins de chaque zone de production. De nos jours, l'agrumiculture moderne repose sur la culture intensive de plants greffés. Ainsi, les objectifs d'amélioration des porte-greffes et des variétés peuvent être généralement dissociés, simplifiant le schéma d'amélioration.

3.1. Objectifs d'amélioration des porte-greffes

La principale fonction des porte-greffes est de faciliter l'adaptation des variétés aux différentes conditions environnementales dans les différentes zones de culture. L'utilisation de porte-greffes a été conditionnée par l'apparition de certaines maladies causant de graves pertes économiques. Ainsi, le premier porte-greffe utilisé dans le monde fut le bigaradier (*Citrus aurantium* L.) pour sa tolérance aux *Phytophthora* sp. De plus, il est l'un des rares à tolérer aussi bien des sols calcaires que des sols acides, l'hygromorphie et dans une certaine mesure, la salinité (Grosser et Chandler 2004). Cependant, les bigaradiers se sont avérés particulièrement sensibles à la maladie de la tristeza, apparue au début du 20^{ème} siècle. La diffusion de la tristeza, à la quasi-totalité de l'aire de production des agrumes, entraîna la mort de près de 100 millions d'orangers et de mandariniers greffés sur bigaradier (Figure 7). Actuellement, un nombre limité de porte-greffes est disponible et ils doivent préalablement être testés dans les différentes conditions pédoclimatiques avant d'être cultivés.

Le travail d'amélioration des porte-greffes consiste à obtenir des génotypes résistants ou tolérants aux contraintes biotiques et abiotiques. Les premiers critères recherchés sont une bonne

adaptation aux sols alcalins ou acides, une bonne tolérance aux pathogènes du sol en particulier aux *Phytophthora sp.* et aux nématodes et une tolérance à la tristeza. De plus, le porte-greffe doit être compatible avec la variété et favoriser une forte productivité ainsi qu'une bonne qualité des fruits comme le calibre, l'épaisseur de la peau, la teneur en jus ou la saveur du fruit (Khan et Kender 2007). Les porte-greffes entraînant une entrée rapide en production de la variété sont également recherchés. La production de semences vigoureuses avec une polyembryonie élevée est un autre aspect souhaité par le pépiniériste, car il facilite la propagation et l'uniformité des plants et réduit les coûts de production.

D'autres critères plus spécifiques des régions peuvent être également pris en considération. Ainsi, la résistance au froid pour la Floride, le Japon ou la Géorgie, la tolérance au stress hydrique, au calcaire ou à la salinité pour certains pays du bassin méditerranéen, constituent des critères particulièrement importants.

3.2. Objectifs d'amélioration des variétés

Le travail d'amélioration des agrumes consiste à obtenir de nouvelles variétés répondant aux exigences des producteurs, des consommateurs et des circuits de distribution. Les objectifs d'amélioration seront différents selon la destination finale des fruits :

Pour le marché du fruit frais, la qualité des fruits est le critère essentiel. Celle-ci varie en fonction de chaque pays et de chaque groupe de fruit. Dans les pays occidentaux, elle est déterminée par la coloration externe et interne, la teneur en jus, le rapport sucre/acidité, l'arôme et l'aspermie. Des différences d'appréciation notables existent toutefois entre les différents pays européens. En France, les variétés acidulées sont recherchées tandis qu'en Angleterre et dans les pays du Nord, la douceur et les forts taux de sucre sont très prisés. Dans les zones tropicales, la teneur en jus et en sucre ainsi que la faiblesse de l'acidité sont les principales qualités requises tandis que le manque de couleur n'est pas rédhibitoire. La productivité, l'étalement de la production, la disponibilité d'une gamme variétale, la tenue du fruit sur l'arbre, la facilité d'épluchage et le comportement des fruits après récolte constituent également des objectifs importants des programmes de sélection. Des variétés tardives de qualité de type clémentines/mandarines sont ainsi particulièrement attendues par le marché. Les consommateurs sont de plus en plus exigeants pour la qualité, accroissant la compétitivité sur les marchés

internationaux. Le maintien de l'attractivité et de la compétitivité dépend fortement de la disponibilité de nouvelles variétés répondant aux attentes des producteurs et des consommateurs. Le travail de l'améliorateur consiste à développer une gamme variétale correspondant au plus près aux désirs subjectifs de chacun.

Pour l'industrie de la transformation en jus, les orangers sont principalement concernés. Les principaux critères sont la productivité des orangers, la teneur en jus et en sucre ainsi que la nature des pigments. La production de jus de pomelo, de citron et de clémentine bien que marginale par rapport à l'ensemble du marché du jus, peut être une source de diversification dans certaine région. Pour les pomelos et les citrons, la teneur en jus est l'élément le plus important. Actuellement, le jus de clémentine et de mandarine se développe et la recherche tend vers de nouveaux hybrides produisant des jus de qualité, riches en polyphénols avec une haute valeur santé (Rapisarda *et al.* 2009).

3.3. Amélioration des agrumes par recombinaison sexuée

Une des principales fonctions de la reproduction sexuée est de produire un brassage génétique, grâce à la recombinaison génétique. La recombinaison par voie sexuée est utilisée depuis longtemps en amélioration génétique pour créer de nouveaux hybrides et/ou introgresser certains caractères dans un fond génétique particulier. Chez les agrumes, les premiers programmes importants de création par hybridation sexuée ont été entrepris en Floride à l'USDA (United States Department of Agriculture) en 1893. Depuis, de très nombreux pays ont également démarré des programmes de création par croisements sexués. Bien que la phase de juvénilité soit longue, des résultats très intéressants ont été enregistrés en particulier pour les porte-greffes. Ainsi certains hybrides « intergénériques » *Poncirus* x *Citrus* s'avèrent être d'excellents porte-greffes comme, par exemple, certains citrumelos (*Poncirus* x pomelo) tels que "4475", "Swingle" ; certains citranges (*Poncirus* x orangers) tels que "Troyer", "Carrizo", "C35" et certains citrandarins (*Poncirus* x mandariniers) tels le "FA5" et le "FA13" (Forner-Giner *et al.* 2009). De très nombreux cultivars intéressants ont été obtenus tels que les mandariniers "Wilking", "Kinnow", "Frémont", "Sunburst"... mais beaucoup souffrent d'un nombre élevé de pépins, limitant très fortement leur succès commercial.

3.4. La part croissante des biotechnologies en amélioration des agrumes

3.4.1. La culture *in vitro* (CIV)

La culture *in vitro* a été développée chez les agrumes dans les années 60. Elle est devenue un outil quasi indispensable en amélioration des plantes. Elle permet de multiplier végétativement du matériel, de faire du sauvetage d'embryons précoces, de l'embryogenèse somatique, et d'assainir des agrumes par microgreffage d'apex indemnes de maladie (Navarro *et al.* 1975). Le milieu le plus couramment utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962) et sa version modifiée par Murashige et Tucker (1969). Ce dernier est très utilisé pour le sauvetage précoce d'embryons avortés.

3.4.2. L'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique permet des taux de multiplication clonale élevés de matériel sain. Chez les agrumes, l'embryogenèse somatique est induite par la culture *in vitro* d'ovules d'espèces polyembryonnées (Ollitrault et Luro 1995; Rangan *et al.* 1969). Elle peut aussi être induite par culture de styles (Carimi *et al.* 1995). Chez certaines espèces telles que les *Citrus*, la capacité de régénération d'une plante entière n'est conférée que par les protoplastes issus de calcs embryogènes. En effet, dans les conditions de culture utilisées, les protoplastes issus de mésophylles foliaires de *Citrus* ne présentent pas d'aptitude à la régénération. La constitution de collection de calcs embryogènes est donc un préalable à la mise en œuvre du programme d'hybridation somatique (Ollitrault et de Rocca Serra 1992b).

3.4.3. L'hybridation somatique

L'hybridation somatique est une technique développée dans les années 70 qui consiste à fusionner des protoplastes de deux parents génétiquement différents (Kao et Michayluk 1974). Elle a pu être développée, chez un certain nombre d'espèces végétales, grâce à deux propriétés : (1) la capacité d'obtention de protoplastes isolés en grande quantité, (2) leur totipotence. Cette étape de régénération de plantes à partir de protoplastes, est bien maîtrisée grâce aux nombreux travaux effectués sur plus de trois cent vingt espèces (Waara et Glimelius 1995). Les premiers hybrides somatiques ont été obtenus après un traitement chimique au polyéthylène glycol (PEG)

(Kao et Michayluk 1974). Le traitement au PEG induit l'agglutination des protoplastes et lors de la dilution de ce mélange avec une solution contenant une grande concentration de Ca^{2+} et un pH élevé, les fusions ont lieu. Cette technique reste actuellement la plus utilisée.

Au début des années 80, une autre technique permettant d'obtenir des hybrides somatiques par électrofusions de protoplastes a été établie (Zimmermann et Scheurich 1981). Les protoplastes placés dans un milieu ayant une faible conductivité, sont soumis à un champ électrique entre deux électrodes. Ce champ électrique créé par un courant alternatif permet la polarisation des protoplastes et leur alignement (Figure 8). L'application, très brève, de courant continu de forte intensité désorganise temporairement les membranes et permet la fusion des protoplastes (Sihachakr *et al.* 1988). Plus récemment, une nouvelle méthode combinant l'agrégation des protoplastes par le polyéthylène glycol et l'ouverture des pores membranaires par une décharge de courant continu a permis d'obtenir des hybrides somatiques (Olivares-Fuster *et al.* 2005). L'hybridation somatique permet ainsi d'introgesser des gènes provenant d'espèces sexuellement incompatibles ou de génotypes stériles. Cette technique élargit ainsi grandement le pool des ressources génétiques disponibles (Bravo et Evans 1985; Grosser *et al.* 1996a; Lefrançois *et al.* 1993). Par l'association complète de deux génomes nucléaires, elle permet par ailleurs de créer des polyploïdes (Figure 9). Cette technique s'est avérée particulièrement importante pour gérer la diversité au sein de pools géniques polyploïdes. Ainsi de nombreux travaux ont porté sur le complexe d'espèces des *Solanaceae* (Masson et Pelletier 1987; Oberwalder *et al.* 1998; Pelletier *et al.* 1983) ou celui des *Brassicaceae* (Glimelius *et al.* 1991; Téoulé 1992). L'hybridation somatique a également été appliquée avec succès pour introgresser des caractères ponctuels d'espèces sauvages *via* des méthodes de fusions asymétriques. De nouvelles combinaisons nucléo-cytoplasmiques peuvent être obtenues (Figure 9). Ce matériel est particulièrement intéressant pour la recherche de stérilité mâle nucléo-cytoplasmique mais également afin de transférer certains caractères de résistance à déterminisme cytoplasmique (Barsby *et al.* 1987; Pelletier *et al.* 1983; Thomzik et Hain 1988; Vardi *et al.* 1987). C'est sans conteste chez les Solanacées que l'on répertorie le plus grand nombre d'expériences positives d'hybridations somatiques (Puite *et al.* 1986; Sihachakr *et al.* 1988; Waara et Glimelius 1995). De nombreux succès ont aussi été rencontrés chez les Crucifères, les Ombellifères et les Rutacées (Téoulé 1992).

Les premiers hybrides somatiques obtenus chez les agrumes proviennent d'une combinaison entre des protoplastes de cals embryogènes de *Citrus sinensis* "Trovita" et des protoplastes de feuilles de *Poncirus trifoliata* (Ohgawara *et al.* 1985). Ces deux espèces bien qu'appartenant à des genres différents sont compatibles sexuellement. Les premiers hybrides somatiques sexuellement incompatibles résultent d'une fusion entre *Citrus sinensis* "Hamlin" et *Severinia disticha* (Grosser *et al.* 1988b). Afin d'introduire des caractères intéressants, des hybridations somatiques ont été tentées avec des espèces plus éloignées appartenant à des sous-tribus et même à des tribus différentes. Mais ces hybrides somatiques ne représentent qu'une faible partie du matériel régénéré. Seuls cinq hybrides somatiques inter sous-tribu ou intertribu ont pu être acclimatés soit sur leurs propres racines, soit après greffage. Ainsi, des hybrides intertribu ont pu être obtenus entre *Citrus sinensis* "Trovita" et *Murraya paniculata* (Hidaka *et al.* 1992), entre *Clausena excavata* et *Citrus aurantifolia* "Mexicaine" (Froelicher 1999) ou entre *Citrus sinensis* et *Clausena lansium* (Guo et Deng 1999). Ces derniers mentionnent que l'hybride *Citrus sinensis* et *Clausena lansium* est hexaploïde alors que les parents étaient diploïdes. Tous les auteurs font état de problèmes au cours de la phase de développement. Parfois, les embryons ne germent pas, tout en survivant pendant un an (Motomura *et al.* 1997).

La fusion de protoplastes peut conduire également à la production d'hybrides somatiques diploïdes appelés cybrides. Ces nouvelles associations nucléo-cytoplasmiques peuvent être particulièrement intéressantes pour associer un noyau avec des organites cytoplasmiques présentant des caractères à déterminisme cytoplasmique particuliers tels que la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique mais également certains caractères de résistance (Sidorov *et al.* 1981; Vardi *et al.* 1987). Chez les plantes, les cybrides sont généralement obtenus par fusion asymétrique entre des protoplastes parentaux respectivement irradiés aux rayons X et traités à l'iodoacetate (Sidorov *et al.* 1981; Vardi *et al.* 1987). Sur agrumes, des cybrides ont été obtenus spontanément lors de fusion cals/feuilles ou cals/cals (Grosser *et al.* 1996b; Moreira *et al.* 2000a; Ollitrault *et al.* 1996c; Yamamoto et Kobayashi 1995). Le taux de cybrides régénéré dans les produits de fusion peut être augmenté par certaines techniques tels que l'hybridation somatique mixte chimique/physique ((Olivares-Fuster *et al.* 2005)) et les fusions asymétriques, après irradiation aux UV (Dambier, communication personnelle). Ces dernières années, des efforts ont été fait pour transférer le génome mitochondrial des mandariniers "Satsuma", qui possèdent des

gènes de stérilité, avec des génomes nucléaires de divers agrumes fertiles (Cai *et al.* 2009; Cai *et al.* 2007; Guo *et al.* 2004a; Xu *et al.* 2006).

L'analyse moléculaire des génomes cytoplasmiques des produits de fusion montre que les mitochondries proviennent systématiquement du parent cal lors de combinaisons cal/feuilles (Cabasson *et al.* 2001; Grosser *et al.* 1996b; Moreira *et al.* 2000a, b; Moreira *et al.* 2002). Ces auteurs suggèrent un contrôle mitochondriale dans l'aptitude à la régénération et le processus d'embryogenèse. Cependant, certains hybrides somatiques et cybrides issus de fusions cal/feuilles possèdent des mitochondries recombinées ((Liu *et al.* 2002; Moreira *et al.* 2000a; Vardi *et al.* 1987) ; nos résultats non publiés). Seule une partie du génome mitochondrial pourrait être impliqué dans ce contrôle. En revanche, les chloroplastes présentent une hérédité monoparentale aléatoire.

3.5 L'aspermie : de la mutation au contrôle génétique

L'aspermie est l'une des caractéristiques les plus importantes pour les mandarines sur le marché des fruits frais en occident, car les consommateurs n'acceptent pas les pépins dans les fruits (Ollitrault *et al.* 2007a).

Plusieurs stratégies ont été développées pour la création de variétés sans pépin, faisant appels pour la plupart aux biotechnologies:

3.5.1. La création et la sélection de variétés auto-incompatibles.

Chez les agrumes, l'auto-incompatibilité est observée depuis de nombreuses années (Nagai et Tanikawa 1928; Soost 1969). Les pamplemoussiers (*Citrus maxima*) ont été décrits comme étant totalement auto-incompatibles ainsi que quelques hybrides de mandariniers tels que le clémentinier (*Citrus reticulata* x *C. sinensis*), les tangelos (*Citrus reticulata* x *C. paradisi*) "Minneola", "Orlando" et "Robinson" (Soost 1965; Soost 1969). Aujourd'hui, la quasi totalité des variétés de mandariniers dans le bassin méditerranéen, dont les clémentiniers cultivés, sont auto-incompatibles. Lorsqu'ils sont cultivés en bloc monoclonal, ils produisent des fruits sans pépin. Des variétés récentes telles que "Clémenvilla", "Fortune", "Afourer" ainsi que "SugarBelle" doivent leur intérêt commercial à leur auto-incompatibilité. L'auto-incompatibilité a été décrite, au travers d'une série de croisements, chez les agrumes comme étant de type gamétophytique

(Soost 1969), gouvernée par une série d'allèles et comme étant dominante. D'après Ueno (1978), la compatibilité entre *C. tachibana* et *C. hassaku* n'est pas réciproque. Il suggère que l'auto-incompatibilité est contrôlée par plus d'un gène. Soost (1969) et Vardi *et al.* (1998) ont tenté d'établir un modèle, mais celui-ci ne fonctionne pas dans tous les cas. L'unilatéralité de l'incompatibilité, dans certains croisements réciproques entre variétés auto-incompatibles, a profondément perturbé les généticiens travaillant sur le modèle "agrume" et a compliqué le travail des sélectionneurs qui tentent de prédire la présence de ce caractère dans les descendances. De plus, l'auto-incompatibilité n'est pas toujours totale. Certaines variétés peuvent avoir une fertilité en autofécondation résiduelle faisant penser à un caractère quantitatif. Ainsi, les déterminants génétiques de l'incompatibilité sont encore totalement inconnus chez les agrumes. Une meilleure connaissance de ces déterminants permettrait aux sélectionneurs de prédire l'auto-incompatibilité ou de faire de la sélection par marqueurs de manière précoce.

3.5.2. La recherche de mutants stériles

La sélection de mutations spontanées est la méthode d'amélioration des agrumes la plus ancienne. Elle a permis une diversification phénotypique au sein de structures hybrides telles que les orangers, les citronniers, les pomelos et les clémentiniers. De nombreuses mutations portant sur la qualité, la couleur et la forme du fruit, l'étalement de la précocité et l'amélioration du calibre ont été sélectionnées. Ce mode de diversification a, dans un premier temps, été rendu possible par l'apomixie, puis plus tard par le greffage. Cette dernière technique a rendu possible la sélection de mutants stériles. La stérilité gamétique peut être soit d'ordre génétique, soit d'ordre physiologique et due à des facteurs environnementaux comme des basses températures (Iwamasa et Iwasaki 1963 cité par Frost et Soost 1968), ou à l'utilisation de certains porte-greffes (Brieger et Gurgel 1941 cité par Frost et Soost 1968). Elle peut être totale, affectant les gamètes mâles et femelles comme chez l'oranger "Washington Navel" ou partielle comme chez les pomelos "Marsh" et le citronnier "Eureka". Des études cytogénétiques ont mis en évidence que les origines de la stérilité chez l'oranger "Valencia", le limettier "Mexicain" et le *Citrus junos* sont dues respectivement à des translocations, des inversions et des phénomènes d'asynapsie (Iwamasa 1966). Depuis une trentaine d'année, l'homme cherche à amplifier ce processus naturel. La mutagénèse induite s'est avérée être un bon outil pour la recherche de cultivars aspermes (Hearn 1984). Ainsi, de nombreux programmes ont été conduits en vue de rendre stérile des variétés à

pépins très intéressantes au niveau organoleptique. Le premier succès commerciale a été obtenu avec le pomelo "Star Ruby", issu d'irradiation de graines de la variété "Hudson" (Roose et Williams 2007). On notera actuellement la mise sur le marché des variétés "Mor" et "Tango" issues respectivement des programmes d'irradiation de "Murcott" (Vardi et al, <http://www.freepatentsonline.com/PP08378.pdf>) et "Afourer" (Roose et Williams, <http://www.freepatentsonline.com/PP17863.pdf>).

3.5.3. La stérilité mitochondriale

La stérilité mâle est relativement répandue dans le règne végétal. Elle se manifeste par une absence d'anthers, des anthers vides ou du pollen non viable. Elle peut être suscitée spontanément par le biais de mutations dans le génome nucléaire et/ou cytoplasmique. La stérilité mâle cytoplasmique (CMS) est généralement causée par le génome extranucléaire, les mitochondries. Cependant, elle peut être contrôlée par l'interaction entre les facteurs cytoplasmiques et nucléaires.

Dans le cas d'une stérilité cytoplasmique (mitochondriale), cette stérilité est totalement transmise à la descendance si l'hérédité cytoplasmique est maternelle. En revanche, dans le cas d'une stérilité génique et cytoplasmique, cette stérilité ne sera que partiellement transmise à la descendance. Elle se manifeste quand un gène de stérilité récessif est à l'état homozygote (rr) dans un cytoplasme stérilisant S que l'on oppose au cytoplasme normal N. Ainsi, le parent mâle aura la capacité de restaurer la fertilité dans la descendance, même en présence d'un cytoplasme S.

Chez les agrumes, la stérilité mâle cytoplasmique a été décrite pour la première fois chez les mandariniers "Satsuma" (Iwamasa 1966). Toutefois, au travers d'une série de croisements comprenant des hybrides possédant le cytoplasme de "Satsuma", Yamamoto *et al.* (1997) ont démontré que l'avortement des anthers était causé par une interaction gène/cytoplasme.

3.5.4. La recherche de stérilité *via* la triploïdie

En plus de l'aspermie des nouvelles variétés, il est également important de sélectionner des cultivars incapables de polliniser les variétés existantes auto-incompatibles. La triploïdie répond à cet objectif puisqu'elle entraîne généralement une stérilité mâle et femelle, empêchant toutes pollinisations croisées sur des cultivars auto-incompatibles. Combinée à la parthénocarpie, la

triploïdie est un autre moyen d'obtenir des fruits sans pépin. Ainsi, la synthèse d'hybrides au niveau triploïde apparaît comme une stratégie particulièrement intéressante (Cameron et Burnett 1978; Starrantino 1992). Elle est aujourd'hui développée dans de nombreux programmes d'amélioration variétale chez les agrumes (cf paragraphe 3.6.3).

3.6. Gestion de la ploïdie

Comme nous venons de le voir, la triploïdie est devenue une composante importante des programmes d'amélioration des agrumes. La gestion du niveau de ploïdie requiert une bonne connaissance du système de reproduction, et de la génétique des différentes ressources biologiques utilisées dans les programmes de création variétale ainsi que la maîtrise de certains outils de biotechnologie.

3.6.1. Obtention d'haploïdes

3.6.1.1. Formation d'haploïdes naturels

Différents mécanismes tels que l'androgenèse, l'élimination de chromosomes, les réductions somatiques, l'apogamie et la parthénogenèse comprenant la gynogenèse, permettent d'obtenir des plantes haploïdes (Demarly et Sibi 1996; Khush et Virmani 1996). Ces mécanismes peuvent être spontanés.

La première plante haploïde spontanée a été découverte chez *Datura stamonium* par Blakeslee *et al.* en 1922. La formation spontanée d'un haploïde provient généralement de la gynogenèse avec la formation d'une graine haploïde. Des cas d'androgenèses spontanées sont décrits, chez certaines plantes telles que le riz et les *Solanaceae*, avec la formation d'embryons haploïdes directement dans les anthères (Ramanna et Hermsen 1974).

Chez les agrumes, quelques rares cas d'haploïdisations spontanées ont été rapportés en particulier chez les pamplemoussiers (Toolapong *et al.* 1996) et le clémentinier (nos résultats, non publiés). Ces haploïdes peuvent être issus de graines normales (nos résultats non publiés) ou de graines avortées (Toolapong *et al.* 1996). Récemment, nous avons évalué le taux d'haploïdisations spontanées chez six génotypes de pamplemoussiers. Sept cent cinquante plants de semis, obtenus à partir de graines normales issues de pollinisations libres, ont été analysés par cytométrie en flux. Il ressort que le pourcentage d'haploïdisation varie de 0% pour les

pamplemoussiers "Kao Pan" et "Deep Red" à 0.4% pour les pamplemoussiers "Reinking" et "Chandler" (Figure 10). Un pourcentage similaire a été obtenu lors d'un croisement contrôlé entre "Chandler" x clémentinier. L'analyse moléculaire de ces haploïdes confirme bien qu'ils sont le produit de la gynogenèse (Froelicher *et al*, en cours).

3.6.1.2. Obtention d'haploïdes par gynogenèse induite et androgenèse *in vitro*

L'obtention de plants haploïdes a toujours suscité un intérêt en amélioration des plantes pour l'obtention de lignées pures avec les haploïdes doublés, en génétique pour la constitution de populations d'haploïdes doublés, pour la réalisation de cartes génétiques et récemment en génomique pour le séquençage d'un génome haploïde. Comme de nombreuses espèces ligneuses, les agrumes sont décrits comme étant récalcitrants aux haplo-méthodes (Germana et Chiancone 2001). Des essais ont été réalisés par androgenèse *in vitro*. Les premiers embryons ou/et des plantes haploïdes ont été obtenus chez *Poncirus* (Hidaka *et al.* 1979), *C. microcarpa* (Chen *et al.* 1980), *C. sinensis* "Trovia" (Hidaka 1984), *C. clementina* (Germana et Chiancone 2003; Germana *et al.* 1994), *C. limon* (Germana *et al.* 1992) et tangelo (*C. deliciosa* x *C. paradisi*) "Mapo" (Germana et Reforgiato Recupero 1997). Cependant, en dépit d'efforts considérables, l'androgenèse *in vitro* n'a donné aucun résultat chez de nombreux génotypes et le nombre d'haploïdes est très limité (Germana 1997). La faiblesse de l'androgenèse *in vitro* a poussé au développement d'autres méthodes alternatives (Germana et Chiancone 2001). Ainsi, la gynogenèse induite a été testée chez les espèces monoembryonnées. Les premiers haploïdes ont été obtenus après pollinisation de *C. clementina* et *C. reticulata* "Lee" (diploïde) par du pollen triploïde (Oiyama et Kobayashi 1993). L'induction d'haploïdes *in situ* par pollinisation avec du pollen irradié est une technique couramment utilisée chez certaines espèces. Des plantes haploïdes ont été obtenues après pollinisation avec du pollen irradié à 300, 600, ou 900 grays chez *C. clementina* (Ollitrault *et al.* 1996a), *C. reticulata* "Fortune" et *Citrus reticulata* x *Citrus sinensis* "Ellendale" (Figure 11) (Froelicher *et al.* 2007) et *C. reticulata* "Wilking". Chez ce dernier, des diploïdes issus de 2n gamètes ont également été régénérés (publication en cours). En revanche, aucun haploïde de pamplemoussier n'a été obtenu par cette méthode en dépit de nombreux essais (nos travaux, non publiés), ce qui est surprenant au regard des résultats récents sur la capacité des pamplemoussiers à produire spontanément des haploïdes (paragraphe précédent).

3.6.2. Augmentation du pool de tétraploïdes

3.6.2.1. Formation de tétraploïdes spontanés

Chez les agrumes, l'apparition de tétraploïdes spontanés est relativement fréquente chez les espèces polyembryonnées (Cameron et Frost 1968; Cameron et Soost 1969). Longley (1925) a été le premier à signaler des formes tétraploïdes chez le kumquat "Hongkong" à l'état sauvage (*Fortunella hindsii* Swing.) tandis que Frost (1925) a observé des tétraploïdes parmi un semis de graines polyembryonnées d'oranger "Paperrind" et de citronnier "Lisbonne", qui se caractérisent par des feuilles plus épaisses. Depuis, des tétraploïdes issus de semis polyembryonnés ont été identifiés chez de très nombreux génotypes (Barrett et Hutchison 1978; Hutchinson et Barrett 1981; Russo et Torrisi 1951).

Les taux de tétraploïdisation spontanée dépendent fortement des génotypes, pouvant varier de moins de 1% à 8% (Barrett et Hutchison 1978, nos résultats, en cours). Ils sont faibles chez le limettier "Mexicain" et le kumquat "Marumi" mais peuvent atteindre 8% chez le mandarinier "Méditerranéen" (nos résultats, non publiés). De même, au sein des orangers, des variations importantes peuvent être observées entre les différents mutants. Ainsi, la variété "Pineapple" produit 4% de tétraploïdes tandis que les variétés "Shamouti" et "Moro" n'en produisent que 1% (nos résultats, non publiés). Toutefois, il est important de noter que ce caractère est variable car pour un même génotype, les taux peuvent fluctuer d'une année sur l'autre ou en fonction des conditions environnementales. Ainsi, le climat de la Corse est nettement plus favorable que le climat tropical humide de la Martinique et le climat subtropical des îles Marquises. Le facteur climatique, en particulier la température serait responsable de ces variations de ploïdie (Aleza et nos résultats, publication en cours). Depuis l'avènement de la cytométrie en flux, la recherche de tétraploïdes dans des semis de graines polyembryonnées est la technique la plus simple pour diversifier le pool des géniteurs tétraploïdes. En revanche, ces plantes présentent une phase de juvénilité généralement plus longue que les diploïdes (nos résultats, non publiés).

L'étude effectuée sur l'origine des tétraploïdes spontanés indique qu'ils proviennent du doublement spontané des tissus nucellaires (Cameron et Frost 1968). Toutefois, quelques cas de tétraploïdes spontanés issus d'hybridation ont été observés dans un semis d'oranger "Pineapple" et de citronnier "Eureka" (nos résultats, non publiés).

Chez les espèces monoembryonnées, des tétraploïdes peuvent également apparaître spontanément dans des croisements entre diploïdes (Esen et Soost 1973; Hutchinson et Barrett 1981). L'étude de l'origine de ces plantes à l'aide de marqueurs SSR a montré qu'elles résultent de la fécondation de deux gamètes non réduits. Ces événements restent cependant très rares (nos résultats, non publiés).

3.6.2.2. Doublement à l'aide d'agent mitoclasique

Pour les géotypes monoembryonnés, le doublement avec un agent chimique s'impose si l'on ne veut pas de recombinaison sexuée. L'agent chimique le plus couramment utilisé est un agent mitoclasique, la colchicine. Il bloque la division cellulaire à la prophase et à la métaphase, empêchant la formation des fibres fusoriales et la séparation des chromosomes accolés au niveau de la plaque équatoriale. Les premiers essais ont été réalisés sur bourgeons *in vivo* (Barrett 1974). Néanmoins, la majorité des géotypes sont chimériques, sans valeur pour la sélection végétale. Plus récemment, des cals embryogènes ont été traités à la colchicine avec succès, pour obtenir des plantes tétraploïdes (Gmitter Jr et Ling 1991; Gmitter Jr *et al.* 1991; Zhang *et al.* 2007). Wakana *et al.*, (2005) ont obtenu des tétraploïdes de "Yuzu" (*C. junos*), "Kizu" (*C. kizu*) et "Hanayu" (*C. hanaju*) après traitement de jeunes bourgeons axillaires greffés immédiatement après traitement. Aleza *et al.* (2009) ont combiné avec succès un traitement à la colchicine et à l'oryzalin sur des apex ayant été microgreffés quelques semaines auparavant. Ils ont ainsi pu obtenir des géotypes tétraploïdes de clémentinier. Afin d'augmenter les chances de succès, nous avons développé une technique d'immersion de jeunes plants en pot dans une solution de colchicine. Les plants sont retournés et seule la tige au dessus du point de greffe est immergée. Ainsi de nombreux bourgeons sont traités en une seule fois, multipliant les chances de succès. Cette technique a permis d'obtenir des autotétraploïdes de différentes variétés de clémentinier et des essais sont en cours sur différents géotypes monoembryonnés de mandariniers (nos résultats, non publiés).

3.6.2.3. Obtention de tétraploïdes par hybridation somatique

La création d'hybrides somatiques tétraploïdes a également été utilisée afin d'élargir le pool des géniteurs tétraploïdes (Ollitrault *et al.* 2000a). Plusieurs centaines de combinaisons d'hybrides tétraploïdes ont été obtenus de part le monde (Grosser *et al.* 2000; Ollitrault *et al.*

2007b). Le centre de recherche et d'éducation pour les *Citrus* (CREC) en Floride possède le plus grand nombre de combinaisons d'hybrides somatiques tétraploïdes, tandis que le Cirad en a généré près d'une centaine (Figure 12) (Froelicher 1999; Ollitrault *et al.* 2000a; nos résultats, non publiés). De nombreux hybrides somatiques sont en cours d'évaluation (Ollitrault *et al.* 2007b) ou bien entrent dans le schéma de création de triploïdes (Grosser *et al.* 1992a; Ollitrault *et al.* 2007b). Les premiers hybrides somatiques allotétraploïdes (Ohgawara *et al.* 1985), après avoir démontré une bonne fertilité (Ohgawara *et al.* 1991), ont été utilisés comme géniteurs et croisés avec des diploïdes. Des plantes triploïdes ont été obtenues après sauvetage d'embryons (Ohgawara *et al.* 1991).

3.6.3. Obtention de triploïdes dans le programme d'innovation variétale

La triploïdie intéresse beaucoup les améliorateurs car elle est connue pour présenter un fort niveau de stérilité qui, cumulée avec la parthénocarpie, permet d'obtenir des fruits sans pépin. Dans ce but, trois méthodes principales permettant la genèse d'agrumes triploïdes ont été développées :

3.6.3.1. Recherche de triploïdes dans les populations diploïdes

La triploïdie est relativement peu fréquente dans le règne du vivant et elle est considérée généralement comme une anomalie génétique. Dans les croisements entre diploïdes, elle résulte (1) soit d'une anomalie survenant au cours de la division méiotique qui se caractérise par une non disjonction chromosomique conduisant à la formation de gamètes diploïdes. Lorsqu'un gamète diploïde fusionne avec un gamète normal, il résulte un zygote triploïde ; (2) soit d'une anomalie survenant au cours de la fécondation telle que la non séparation du deuxième globule polaire de l'ovule ou la fécondation d'un ovule par deux spermatozoïdes (dispermie).

Chez les agrumes, la présence de triploïdes a été observée pour la première fois par Lapin (1937) sur des semis de mandariniers "Mikan". Elle a ensuite été signalée dans les descendance de très nombreux génotypes d'agrumes issus de pollinisations libres telles que les citronniers "Lisbonne" et "Eureka", les orangers "Ruby" et "Zanford", le pamplemoussier "Impériale", le clémentinier, différents mandariniers "Ellendale", "Wilking", "Fortune"... qu'ils soient mono ou polyembryonnés ((Chen *et al.* 2008; Esen et Soost 1971; Geraci *et al.* 1982; Ollitrault *et al.* 2007a). Cependant, on retrouve plus fréquemment des triploïdes chez les variétés

monoembryonnées, dans des petits pépins présentant des embryons partiellement avortés (Esen et Soost 1971, 1973). Cette approche est restée longtemps limitée par des taux de triploïdes relativement faibles. L'avènement de la cytométrie en flux a considérablement accéléré leurs sélections (Ollitrault *et al.* 1996b) remplaçant le comptage chromosomique, particulièrement long et fastidieux. De plus, le sauvetage d'embryons immatures, par culture *in vitro*, a fortement accru le taux de germination des petites graines. Ces deux techniques ont permis d'exploiter efficacement ce processus naturel en création variétale. Ainsi, afin de connaître le potentiel de chaque génotype monoembryonné, le taux de triploïdes a été évalué dans leur descendance, faisant ressortir un fort effet génotypique. Un classement des génotypes, en fonction de leur potentiel à générer des triploïdes, a pu être établi. Il est faible chez les pamplemoussiers, le clémentinier (Geraci *et al.* 1975; Ollitrault *et al.* 1996b) mais atteint près de 15% à 30% pour les mandariniers "Wilking" et "Fortune" ((Soost 1987); nos résultats, non publiés). De même, au sein des clémentiniers, des variations importantes peuvent être observées entre les différents mutants (couramment appelés clones ou variétés). Ainsi, la variété "Sidi Aissa", produit 10% de triploïdes dans les petites graines avortées tandis que la variété "Caffin" n'en produit que 1% (nos résultats, non publiés).

Le nombre de géniteurs monoembryonnés femelles intéressant est apparu comme relativement restreint. En vue de l'augmenter, nous avons recherché dans un premier temps les hybrides monoembryonnés, sur les différentes populations diploïdes en ségrégation présentes sur la Station de Recherche Agronomique (SRA) de Corse. Puis, dans un second temps, le taux de petites graines par fruit et le nombre de triploïdes ont été déterminés chez ces génotypes monoembryonnés. Ainsi, sur deux populations en ségrégation clémentinier x mandarinier "Commun" et clémentinier x mandarinier "Carvalalh", 30% des hybrides se sont révélés comme étant monoembryonnés. Parmi ces génotypes monoembryonnés, 18% produisent plus de un petit pépin par fruit, et 36% contiennent plus de 20% de triploïdes. Deux génotypes ont produit 100% de triploïdes à partir de leurs petites graines.

Enfin, les conditions environnementales semblent également fortement affecter la formation de triploïdes. Le climat de la Corse est nettement plus favorable que les conditions semi désertiques du Souss marocain et tropicales humides de la Martinique (nos résultats, non publiés).

Aujourd'hui, des milliers d'hybrides triploïdes de mandariniers, tangors (mandarinier x orange) et tangelos (mandarinier x pomelo) ont pu être obtenus grâce à l'hybridation contrôlée entre diploïdes, le sauvetage d'embryons et la cytométrie en flux. L'Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) a protégé dix-sept obtentions (Navarro, communication personnelle) et deux variétés sont proposées en 2010 à la profession, "Garbi" (Figure 13) et "Safor" (Aleza *et al.* 2010); <http://www.ivia.es/documentos/nuevasvariedades/index.htm>). Le Cirad vient de déposer un dossier de demande de certificat d'obtention variétale pour une variété, nommée "MaHa208", issue d'un croisement clémentinier "MA3" x mandarinier "Hansen" (Figure 14).

Origine génétique des 2n gamètes

L'origine génétique des plantes triploïdes a pu être étudiée par cytogénétique puis à l'aide de marqueurs moléculaires. Elle a été décrite comme étant de type digynie, c'est-à-dire résultant de la fusion d'un ovule diploïde avec un pollen normal (haploïde) et cela pour l'ensemble des populations étudiées ((Esen *et al.* 1979; Luro *et al.* 2004), nos résultats, résultats IVIA, non publiés). Cependant, de rares cas de triploïdie par diandrie, c'est-à-dire résultant de la fusion d'un pollen diploïde avec un ovule normal (haploïde), ont également été observés ((Luro *et al.* 2004), résultats Cirad et IVIA, non publiés). En théorie, les ovules diploïdes peuvent avoir plusieurs origines, l'aposporie, la restitution en première division de méiose (appelée communément FDR (First Division Restitution)), la restitution en deuxième division de méiose (appelé communément SDR (Second Division Restitution)) et/ou encore la restitution post-méiotique. Il ressort que dans l'ensemble des populations étudiées, seules une partie de l'hétérozygotie maternelle est restituée favorisant l'hypothèse d'une restitution de type FDR ou SDR. Le taux de restitution de l'hétérozygotie maternelle est en relation directe avec le taux de crossing-over (Figure 15). Il est variable d'un locus à l'autre en fonction de leur position par rapport au centromère. Ainsi, plus le locus sera proche du centromère, moins il aura de chance de subir un crossing-over alors que plus il en sera éloigné, plus il sera indépendant pouvant subir un crossing-over. Ainsi, dans le cas de la FDR, 100% à 50% de l'hétérozygotie maternelle sera restituée en fonction de l'éloignement avec le centromère (100% lorsque le locus est proche du centromère, 50% lorsqu'il est très éloigné). Dans le cas de la SDR, de 0 à 100% de l'hétérozygotie maternelle sera restituée en fonction de la

proximité avec le centromère (0% lorsque le locus est proche du centromère, 100% lorsqu'il est très éloigné).

Chez le clémentinier, le mandarinier "Fortune" et le mandarinier "Wilking", la restitution de l'hétérozygotie maternelle observée pour l'ensemble des loci est comprise entre 0% et 100% laissant supposer à de la SDR ((Luro *et al.* 2004), Cuenca / Ollitrault, comm pers, nos résultats, non publiés). En revanche, chez l'oranger, la formation des ovules diploïdes a été décrite comme étant de type FDR (Chen *et al.* 2008).

3.6.3.2. Les croisements diploïde x tétraploïde

L'hybridation entre diploïdes et tétraploïdes est couramment utilisée dans le règne végétal, mais également animal, pour générer des triploïdes. Chez les agrumes, elle est en théorie, la méthode la plus appropriée pour obtenir un grand nombre de triploïdes. Dans ce chapitre, nous distinguerons le sens du croisement ainsi que les tétraploïdes issus de doublements chromosomiques et les tétraploïdes issus d'hybridations somatiques.

Le sens de croisement :

2x x 4x (diploïdes doublés):

Cette méthode est la plus ancienne utilisée pour la création de triploïdes (Esen et Soost 1973; Esen *et al.* 1978; Oiyama *et al.* 1981; Starrantino et Recupero 1981). Les tétraploïdes utilisés sont généralement issus du doublement chromosomique au sein des tissus nucellaires. Les croisements 2x x 4x donnent peu de graines de taille normale et beaucoup de graines avortées avec un embryon de toute petite taille (1-2 mm). Les graines normales germent très bien. En revanche, les petites graines sont très difficiles à faire germer et nécessitent une méthode de sauvetage par culture *in vitro* bien particulière (Starrantino et Recupero 1981 ; Grosser, communication personnelle). Les plantes obtenues sont généralement triploïdes, mais peuvent être également tétraploïdes (Esen et Soost 1972). Le génotype femelle diploïde a une forte influence sur le nombre de graines par fruit, sur le taux de triploïdes et de tétraploïdes. Ces derniers proviennent généralement de la fusion d'un ovule diploïde non réduit et d'un pollen diploïde (Esen et Soost 1972; Ferrante *et al.* 2010; nos résultats, en cours). Chez les mandariniers, cette capacité est inversement proportionnelle à la production de 2n gamètes. Ainsi, les génotypes monoembryonnés produisant fréquemment des 2n gamètes, tels que mandariniers

"Wilking" et "Fortune", produiront de nombreux tétraploïdes dans le croisement 2x x 4x. En revanche, la variété "Fallglo", qui ne produit pas de triploïde dans les croisements 2x x 2x, donne d'excellents résultats dans les croisements 2x x 4x. Cependant, ce résultat n'est pas extrapolable à l'ensemble des agrumes. Les pamplemoussiers, qui produisent plus d'une centaine de graines lors de croisements entre 2x, ne donnent que très peu de graines normales et beaucoup de graines vides ou avec un embryon avorté lors des croisements 2x x 4x. Les plantules issues de ces graines sont très majoritairement triploïdes (Kamiri, en cours).

Cette méthode 2x x 4x est à l'origine des premiers pomelos triploïdes "Oroblanco" et "Melogod" (hybrides entre un pamplemoussier diploïde et un pomelo tétraploïde) et des mandariniers triploïdes "Mandalate", "Tacle", "Mandared" (hybrides entre clémentinier ou mandarinier "Fortune" et l'oranger "Tarrocco Rosso" tétraploïdes) (Russo *et al.* 2004; Starrantino 1999). Le pomelo "Oroblanco", également connu sous le nom de "Sweety", est déjà produit commercialement. Les mandariniers sont en phase d'amplification et de plantation commerciale. Leurs fruits devraient apparaître sur le marché européen ces prochaines années.

2x x 4x (hybrides somatiques) :

Ces dernières années, l'hybridation somatique a complété la gamme de tétraploïdes polyembryonnés disponible (Grosser *et al.* 2000). Ces hybrides somatiques sont entrés dans les schémas de création de variétés triploïdes par croisement 2x x 4x dans de nombreux centres de recherche (Grosser *et al.* 2000; Guo *et al.* 2000; Ollitrault *et al.* 2000c; Pavan *et al.* 2007; Tusa et Bosco 1997; Wu *et al.* 2005). Comme avec les diploïdes doublés, la majorité des graines sont petites et très difficiles à faire germer, nécessitant le recours au sauvetage d'embryons. Les plantes obtenues sont généralement triploïdes, mais peuvent être également tétraploïdes et même diploïdes (Ferrante *et al.* 2010, Kamiri, en cours). Le génotype femelle diploïde a une forte influence sur le nombre de graines par fruit, sur le taux de plantes triploïdes, diploïdes et tétraploïdes. Les tétraploïdes sont issus de la fécondation d'un ovule non réduit par du pollen diploïde (Ferrante *et al.* 2010, Kamiri, en cours). Les diploïdes dans les croisements 2x x 4x proviennent de la capacité de certains hybrides somatiques tétraploïdes à produire des gamètes haploïdes (Kamiri, en cours). Le nombre relativement élevé de diploïdes observés dans certains croisements pourrait provenir soit d'une compétition pollinique favorable aux pollens haploïdes

par rapport aux diploïdes, soit d'un ratio de ploïdie de 3:2 entre l'albumen et l'embryon considéré comme favorable au bon développement de l'embryon.

Plusieurs centaines de triploïdes ont été créés en Corse et sont en cours d'évaluation au Maroc et en Corse. Ces arbres sont encore jeunes et n'ont pas encore fructifiés. Cependant, la diversité morphologique des arbres semble beaucoup plus importante que celle observée chez les triploïdes issus des croisements $2x \times 2x$.

Ségrégation des hybrides somatiques

Comme nous venons de le voir, de nombreux hybrides somatiques entrent aujourd'hui dans les schémas de création de triploïdes. Ces hybrides peuvent être intra ou inter-spécifique, voire même intergénérique. La constitution des gamètes produits par les hybrides somatiques tétraploïdes dépend du mode d'association des chromosomes à la méiose. La principale différence avec des autotétraploïdes ou des diploïdes doublés réside dans la possibilité d'avoir quatre allèles différents pour un même locus. Ainsi, les gamètes diploïdes peuvent présenter une très forte hétérozygotie, y compris dans le cadre d'une méiose de type tétrasomique. Afin de mieux appréhender la structure des gamètes diploïdes issus d'hybrides somatiques, nous avons étudié la méiose et la ségrégation alléliques d'un hybride interspécifique entre mandarinier "Willow Leaf" et citronnier "Eureka" et d'un hybride intergénérique mandarinier "Willow Leaf" et *Poncirus trifoliata*.

L'analyse cytogénétique de la méiose des deux hybrides somatiques est caractérisée par la présence d'une majorité de bivalents suivis des tétravalents, monovalents et trivalents (Figure 16). Ce résultat est en accord avec ceux observés précédemment chez trois hybrides somatiques interspécifiques *Citrus sinensis* "Hamlin" + *Citrus jambhiri* "Rough"; *Citrus aurantifolia* "Key" + *Citrus sinensis* "Valencia" (Chen *et al.* 2004) et *Citrus limon* "Femminello" + *Citrus sinensis* "Valencia" (Del Bosco *et al.* 1999).

L'étude de la ségrégation allélique a été réalisée à l'aide de marqueurs de type SSR sur deux populations en ségrégation issues des croisements entre les deux hybrides somatiques et le pamplemoussier *Citrus maxima* "Chandler". La ségrégation a été évaluée suivant la méthode développée par Stift *et al.* (2008) basée sur un modèle de calcul du maximum de vraisemblance tenant compte des différents modèles de ségrégation possibles (disomique, tétrasomique et intermédiaire). Sur les dix-sept loci étudiés, l'hybride somatique mandarinier "Willow Leaf" +

citronnier "Eureka" présente une ségrégation tétrasomique pour neuf loci. Le taux de gamètes formés par appariement aléatoire est compris entre 0.58 et 0.95. Le calcul de vraisemblance du scénario le plus proche des résultats observés ne montre pas de différence significative avec une ségrégation tétrasomique ($p > 0.05$). Pour les huit loci restant, la ségrégation observée est intermédiaire. En effet, le taux de gamètes formés par appariement aléatoire est compris entre 0.24 et 0.76. Le calcul de vraisemblance du scénario le plus proche des résultats observés montre des différences significatives avec une ségrégation tétrasomique ($p < 0.05$) (Tableau 3). De plus, les appariements préférentiels ont lieu entre chromosomes homéologues. Ce type d'appariement est possible lorsque les chromosomes présentent un certain degré d'homologie. Cela a déjà été observé sur des hybrides interspécifiques sexuellement compatibles (Ramsey et Schemske 2002; Stift *et al.* 2008). Les origines génétiques complexes du citronnier peuvent également expliquer cette proportion élevée d'appariements homéologues. En effet, le citronnier serait un hybride entre cédratier et bigaradier, lui-même hybride de mandarinier et pamplemoussier.

L'hybride somatique mandarinier "Willow Leaf" + *Poncirus trifoliata* présente, sur les treize premiers loci étudiés, une ségrégation tétrasomique pour deux loci. Pour les onze autres loci, la ségrégation observée est intermédiaire. Le taux de gamètes formés par appariement aléatoire est compris entre 0.11 et 0.45. Le calcul de vraisemblance du scénario le plus proche des résultats observés montre des différences hautement significatives avec une ségrégation tétrasomique ($p < 0.05$) (Tableau 4). Les appariements ont lieu préférentiellement entre chromosomes homologues pour l'ensemble des marqueurs étudiés.

Lorsque l'on compare les taux de gamètes formés par appariement aléatoire entre les deux hybrides somatiques, on observe qu'ils sont plus élevés au niveau interspécifique qu'au niveau intergénérique. Ainsi, avec l'augmentation de la distance génétique, la proportion de gamètes formés par appariement aléatoire diminue. Ce travail est en cours de finalisation par M. Kamiri. L'objectif est d'avoir au moins deux à trois marqueurs par groupe de liaison afin de valider nos résultats pour chacun des groupes.

Ce résultat est en accord avec la biologie de la reproduction des agrumes car même si l'on parle d'espèces ou de genres différents, les *Citrus* sp. et les *Poncirus* sont sexuellement compatibles et donnent des descendance fertiles.

Une ségrégation de type tétrasomique entraîne donc une diversité inter-gamétique considérable. Ainsi, lors d'une hybridation entre un parent femelle et un hybride somatique

(addition des génomes nucléaires de deux parents) pour un locus donné présentant six allèles différents entre les trois parents, le nombre de combinaisons alléliques potentielles maximales chez l'hybride triploïde varie entre douze (six combinaisons x deux gamètes haploïdes femelles) et vingt (dix combinaisons x deux gamètes haploïdes femelles dont quatre combinaisons provenant de doubles réductions lors de la formation de tétravalents (Wu *et al.* 2001)). En cas de disomie, pour un locus donné, le nombre de combinaisons alléliques n'aurait été que de huit (quatre combinaisons x deux gamètes haploïdes femelles).

En terme de sélection, cela signifie que la variabilité phénotypique théorique sera très grande dans ces populations de triploïdes. Cette prédiction est confirmée par les importantes différences phénotypiques observées au champ au sein d'une population triploïde $2x \times 4x$ (hybride somatique). Cette méthode est donc intéressante pour créer de nouveaux phénotypes mais beaucoup moins si l'on veut se rapprocher des phénotypes parentaux.

4x x 2x :

Longtemps, peu de génotypes monoembryonnés tétraploïdes ont été disponibles, limitant ainsi fortement le sens de ce croisement. Un premier hybride "Temple" x "Dancy" $4x$, obtenu dans les années 60 à Riverside (Californie), a permis la création de nombreux triploïdes, aujourd'hui entrés dans les schémas de sélection. Les croisements entre une femelle tétraploïde et un mâle diploïde engendrent généralement de meilleurs résultats que les hybridations $2x \times 2x$ et $2x \times 4x$ (Aleza *et al.* 2009; Cameron et Burnett 1978; Esen *et al.* 1978; Navarro *et al.* 2002). Les embryons sont généralement mieux développés et quasi systématiquement triploïdes (Cameron et Frost 1968; Soost et Cameron 1975). Le ratio de ploïdie 3:5, entre l'embryon et l'endosperme obtenu avec les croisements $4x \times 2x$, semble plus approprié pour le développement des semences que le ratio 3:4, obtenu en hybridation $2x \times 4x$, en raison de l'avortement d'embryons au cours de leur développement (Esen et Soost 1973; Esen *et al.* 1978). Ces résultats donnent tout leur sens au développement récent de géniteurs tétraploïdes monoembryonnés. Ainsi, l'utilisation d'agents mitoclasiques, tels que la colchicine, a permis d'obtenir des variétés monoembryonnées doublées. Ainsi, Aleza *et al.* (2009) ont été les premiers à utiliser le clémentinier $4x$ dans les croisements $4x \times 2x$. Ils ont obtenu 3250 triploïdes en trois ans (Aleza *et al.* 2009).

Jusqu'à présent, les hybrides somatiques ont été utilisés comme géniteurs mâles car ils sont considérés comme polyembryonnés. En effet, pour la création d'hybrides somatiques, l'un des

parents est issu d'un cal embryogène obtenu à partir de cultivars polyembryonnés. La polyembryonnie étant dominante, les hybrides somatiques sont considérés comme étant polyembryonnés. Actuellement, nous étudions la transmission de la polyembryonnie et du taux de zygotes dans un schéma diallèle (non complet) et dans un test cross d'hybrides somatiques. Les premiers résultats tendent à montrer que deux parents polyembryonnés pourraient donner un hybride somatique quasiment monoembryonné (Rossi, Kamiri, en cours). Le taux de zygotes dans les différents semis issus des hybrides somatiques est actuellement en cours d'étude. Si ce résultat se confirmait, nous pourrions alors utiliser ces hybrides somatiques en tant que géniteurs femelles. Ce schéma de croisement $4x \times 2x$ a déjà débouché sur la sélection de trois variétés protégées, "Shasta Gold", "Tahoe Gold", "Yosemite Gold" (<http://cesandiego.ucdavis.edu/files/16892.pdf>), qui sont aujourd'hui proposées à la profession.

3.6.3.3. L'hybridation somatique haploïde + diploïde

L'hybridation somatique entre protoplastes diploïdes et haploïdes est une méthode originale pour créer du matériel végétal triploïde. Les premiers triploïdes produits par hybridation somatique ont été obtenus entre *Nicotiana glutinosa* (haploïde) et *N. tabacum* (diploïde) (Pirrie et Power 1986) et entre *Lycopersicon esculentum* (diploïde) et *Solanum tuberosum* (haploïde) (Schoenmakers *et al.* 1993).

Cette méthode, permet donc de créer directement par fusion de protoplastes, des hybrides triploïdes en conservant l'intégralité de la constitution génétique des cultivars diploïdes présélectionnés. Chez les agrumes, des fusions ont été réalisées entre une lignée de calcs embryogènes haploïdes de clémentinier, obtenue par gynogenèse induite (Ollitrault *et al.* 1996a) et plusieurs lignées de calcs ou des protoplastes de mésophylles diploïdes. Chaque combinaison a donné de nombreux hybrides triploïdes (Ollitrault *et al.* 1998b, 2000c). Ainsi, un génome haploïde a pu être additionné à de nombreux génomes diploïdes sélectionnés pour leur qualité organoleptique (Ollitrault *et al.* 2000c). Des tétraploïdes, des pentaploïdes et aneuploïdes ont également été régénérés par cette méthode. Ces variations importantes de ploïdie proviennent de l'instabilité du génome haploïde. L'analyse à l'aide de marqueurs moléculaires a mis en évidence que ces variations de ploïdie sont dues à l'hétérogénéité des calcs haploïdes qui contiennent également des cellules diploïdes et triploïdes. Cette technique est limitée par la difficulté à obtenir des plantes ou des calcs haploïdes chez les agrumes. L'hybridation gaméto-somatique

pourrait être une alternative pour contourner les haplométhodes. Elle a été développée avec succès chez *Nicotiana* et *Petunia* pour la création directe de triploïdes (Lee et Power 1988; Pirrie et Power 1986). Chez les agrumes, les premiers essais réalisés se sont avérés peu concluants. Cette technique nécessite l'obtention en masse de protoplastes issus de microspores, ce qui malheureusement, n'a pu être réalisé.

3.7. Conclusions et perspectives

Avec le développement des outils de biotechnologie, la création de ressources biologiques originales a été très riche ces dix dernières années. Des haploïdes, des triploïdes de différentes constitutions génétiques, des diploïdes doublés, des hybrides somatiques et un panel de cybrides ont été obtenus.

Dans le domaine de la création et de la sélection variétale, plusieurs milliers de triploïdes ont été créés et plantés. A partir des premiers hybrides obtenus au milieu des années 90, trois hybrides triploïdes de clémentinier x mandarinier ont été présélectionnés. Une demande de COV pour un premier hybride vient d'être enregistrée.

Fin 2010, plus d'un millier devraient produire des fruits et entrer en phase de sélection. La teneur en sucres, en acides et en jus sont des composantes importantes de la qualité des fruits qui évoluent au cours de la maturation. Le phénotypage de la qualité est basé sur des analyses régulières des solides solubles totaux (appelés plus couramment TSS (total soluble solids)), de l'acidité titrable et de la teneur en jus. Ces techniques traditionnelles d'évaluation de la qualité des fruits sont particulièrement longues et fastidieuses et demandent de grandes quantités de fruits. La spectroscopie proche infrarouge (SPIR) est une technologie éprouvée pour l'évaluation de la qualité de manière non destructive de produits agro-alimentaires, y compris chez les agrumes. La SPIR a été utilisée pour la mesure des teneurs en solides solubles, de la matière sèche et la teneur en sucre, l'acidité et la fermeté des fruits de mandariniers "Satsuma" et d'orangers (Gómez *et al.* 2006; Walsh *et al.* 2004), avec des applications commerciales dans les stations de conditionnement au Japon depuis le milieu des années 1990 (Kawano 1994). En plus du développement d'applications quantitatives et qualitatives, des travaux récents sur le café ont suggéré que le spectre proche infrarouge peut être lui-même considéré comme un caractère phénotypique sous contrôle du génotype et de l'influence de l'environnement (Posada *et al.*

2008). L'héritabilité a été calculée pour des longueurs d'onde individuelle. De plus, l'emploi de la SPIR offre la possibilité d'utiliser le spectre pour déterminer les relations phénotypiques entre les parents et de larges populations d'hybrides issus des programmes d'amélioration. Nous avons récemment déposé un projet Agropolis en partenariat avec Qualisud qui a été retenu. Les premiers essais de calibration devraient commencer en octobre avec le démarrage de la campagne de récolte 2010-2011.

Les avancées prochaines dans le domaine du phénotypage ainsi que dans la caractérisation génétique des différentes populations de triploïdes devraient nous permettre de comparer les structures génétiques et phénotypiques des populations triploïdes obtenues suivant les diverses méthodes, ce qui constitue un objectif important pour ces prochaines années.

La quasi-totalité des variétés de mandariniers (dont le clémentinier) cultivés dans le bassin méditerranéen sont auto-incompatibles. Elles donnent des fruits sans pépins lorsqu'elles sont cultivées en bloc monoclonal. L'auto-incompatibilité revêt donc un caractère économique et qualitatif particulièrement important. Plus de 50% des angiospermes hermaphrodites ont développé des mécanismes d'auto-incompatibilité (AI). L'AI empêche l'autofécondation chez les espèces hermaphrodites et la reproduction entre espèces apparentées, limitant ainsi les effets délétères de la consanguinité. L'incompatibilité est souvent déterminée par un locus majeur complexe, multi-allélique, le locus S. Les déterminants polliniques et stigmatiques de la réaction d'incompatibilité qui ont été identifiés à ce jour dans quelques familles botaniques sont de natures différentes. D'une manière générale, trois types de mécanismes d'AI existent au niveau de leurs éléments distinctifs, le S-locus : l'AI sporophytique chez les Brassicaceae, l'AI gamétophytique chez les Papaveraceae, et l'AI gamétophytique basé sur un système S-ribonucléase (S-RNase) chez les Solanaceae, Rosaceae, et Plantaginaceae (pour revues Zhang et al, 2009). Ces résultats suggèrent fortement que différents mécanismes moléculaires conduisant à l'AI sont apparus de façon indépendante au cours de l'évolution des plantes à fleurs.

Chez les agrumes, comme nous l'avons vu, les mécanismes conduisant à cette auto-incompatibilité ne sont pas connus. Une meilleure connaissance devrait permettre de sélectionner précocement ce caractère.

Les premiers résultats de croisements contrôlés et d'autofécondations nous laissent penser que l'auto-incompatibilité gamétophytique chez les agrumes serait contrôlée par un locus S

comprenant au moins 2 gènes liés. Un premier modèle empirique a été établi permettant d'attribuer des allèles d'auto-incompatibilité à différents mandariniers, oranger, pomélo et tangélo. Actuellement, 4 allèles différents ont été identifiés. Ce modèle devra être validé.

A partir des populations recombinantes, nous souhaitons identifier les zones susceptibles de contenir le ou les gènes impliqués dans l'auto-incompatibilité. Un travail de phénotypage de l'auto-incompatibilité vient de démarrer en ce mois de mai 2010 sur une population en ségrégation. Il consistera à évaluer la fertilité pollinique ainsi que l'auto-incompatibilité. A terme, l'objectif sera de localiser un/des QTL d'auto-incompatibilité, d'identifier des gènes impliqués dans ce processus et de comprendre les mécanismes fonctionnels de l'auto-incompatibilité. Ce travail pourrait faire l'objet d'une thèse.

4. EXPRESSION GENOMIQUE ET PHENOTYPIQUE CHEZ LES AGRUMES POLYPLOÏDES ET LES CYBRIDES

Comme nous venons de le voir, l'hybridation somatique est au cœur de notre projet d'amélioration des agrumes. De ce travail résulte des génotypes originaux tant par leur structure nucléaire que par les nouvelles associations entre génomes nucléaires et cytoplasmiques. Cette stratégie de manipulation des différents génomes soulève de nouvelles questions de recherche sur l'expression phénotypique et génomique chez des hybrides somatiques diploïdes et tétraploïdes. Les objectifs de l'équipe ont été de (1) déterminer l'impact des interactions nucléo-cytoplasmiques sur le phénotype des cybrides et plus particulièrement sur les critères de qualité des fruits, (2) d'analyser la transmission des caractères phénotypiques et transcriptomiques dans un contexte tétraploïde interspécifique.

4.1. Les cybrides

4.1.1. Les interactions nucléo-cytoplasmiques

Au sein du règne végétal, la majeure partie de l'information génétique est contenue dans le noyau, mais une petite partie est également répartie dans les organites cytoplasmiques : les chloroplastes et les mitochondries. Ces organites, qui interagissent avec le génome nucléaire, sont indispensables au bon fonctionnement de la cellule et de la plante entière (Zubko *et al.* 2001). Toutefois, ces interactions nucléo-cytoplasmiques restent peu connues chez les plantes supérieures (Atienza *et al.* 2007; Babiychuk *et al.* 1995; Hanson 1991).

4.1.1.1. Les interactions noyau-mitochondrie

La stérilité mâle cytoplasmique (CMS), très utile dans les programmes d'amélioration chez de nombreuses espèces (Atienza *et al.* 2007), est probablement le caractère le plus important lié à l'incompatibilité nucléo-mitochondriale. Ce caractère est généralement hérité de façon maternelle, c'est-à-dire lié au cytoplasme, et est déterminé par des gènes mitochondriaux. La CMS affecte les organes reproducteurs mâles provoquant des dysfonctionnements comme le

développement anormal de certains organes floraux, l'absence d'étamines, la production de pollens non viables (Pelletier et Budar 2007).

La modification du génome mitochondrial peut aussi se traduire par la formation de mutants respiratoires qui se manifestent par des phénotypes embryonnaires létaux ou alors par des plants chlorosés, qui généralement ne survivent pas (Newton *et al.* 2004). Ces altérations au niveau de l'ADN mitochondrial provoquent une modification de l'expression de certains gènes nucléaires contribuant ainsi à la modification du phénotype (Carlsson *et al.* 2008). En effet, les études moléculaires sur les mutations et les modifications du génome mitochondrial ont montré que l'expression de certains gènes nucléaires, comme ceux codant pour des oxydases secondaires et des protéines de réponse aux chocs thermiques, était affectée (Rhoads et Subbaiah 2007). Ce phénomène de régulation de l'expression des gènes nucléaires par le génome mitochondrial a été appelé "retrograde signalling" (Butow et Avadhani 2004; Liu et Butow 2006; Rhoads et Subbaiah 2007).

4.1.1.2. Les interactions noyau-chloroplaste

Les interactions noyau-chloroplaste ont été étudiées chez des hybrides inter-spécifiques et des cybrides de différentes espèces. Ces études ont montré que le génome chloroplastique d'une espèce peut être fonctionnellement incompatible avec le génome nucléaire de certaines autres espèces (Zubko *et al.* 2002). L'incompatibilité entre le génome nucléaire et le plastome, chez ces hybrides, empêche la différenciation complète des chloroplastes, se traduisant par une déficience en chlorophylle, virescence ou panachure (Stubbe et Steiner 1999; Yao et Cohen 2000; Zubko *et al.* 2001). L'incompatibilité peut également se manifester par la formation de grains de pollen majoritairement inaptes à la germination (Stubbe et Steiner 1999). Les incompatibilités génome nucléaire-plastome ont également été observées dans des croisements inter-spécifiques, chez *Trifolium* (Pandey *et al.* 1987), *Pelargonium* (Metzlaff *et al.* 1982), *Impatiens* (Arisumi 1985) et *Zantedeschia* (Yao *et al.* 1994). Toutefois, les mécanismes génétiques contrôlant cette incompatibilité sont encore mal compris (Yao et Cohen 2000; Zubko *et al.* 2002).

4.1.2. L'interaction nucléo-cytoplasmique chez les cybrides d'agrumes

Les agrumes constituent l'un des rares modèles de ligneux pérennes permettant d'étudier les interactions nucléo-cytoplasmiques. La création de cybrides a pour objectif principal de modifier

certaines caractères d'intérêt agronomique liés aux génomes cytoplasmiques ou à l'interaction nucléo-cytoplasmique.

4.1.2.1. La stérilité mâle cytoplasmique

Chez les plantes, le problème le plus répandu, lié aux interactions nucléo-mitochondriales, est un développement floral altéré conduisant à la stérilité du gamétophyte mâle (Hanson et Bentolila 2004). Des cybrides combinant différents noyaux de variétés intéressantes avec la mitochondrie du mandarinier "Satsuma", identifié comme possédant une stérilité mâle cytoplasmique par Yamamoto *et al.* (1997), ont été récemment produits (Cai *et al.* 2007; Guo *et al.* 2004a). Ces cybrides devraient entrer bientôt en fructification, ce qui permettra d'établir si les nouvelles interactions nucléo-mitochondriales engendrent l'obtention de cultivars aspermes sans altération de la qualité organoleptique des fruits (Ollitrault *et al.* 2007b).

4.1.2.2. La résistance aux maladies

Tusa *et al.* (2000) ont évalué la résistance au "mal secco" de cybrides de citronnier "Femminello" (parent sensible) possédant le cytoplasme d'oranger (parent tolérant). La faible mortalité observée après inoculation avec des souches de *Phoma tracheiphila*, suggère que des mécanismes spécifiques de tolérance au "mal secco" pourraient être activés par l'interaction nucléo-cytoplasmique chez ces nouveaux génotypes (Tusa *et al.* 2000).

4.1.2.3. La modification phénotypique

Au CREC en Floride, de nombreux cybrides d'orangers possédant le cytoplasme de mandariniers sont en phase d'évaluation agronomique. L'observation de ces cybrides a mis en évidence des variations pour des caractères importants comme la date de maturité et le nombre de pépins (Grosser *et al.* 2000). Nos résultats sur des cybrides similaires et sur ces mêmes caractères sont identiques. Il est cependant impossible pour l'heure de distinguer si ces modifications phénotypiques proviennent de cette nouvelle interaction nucléo-cytoplasmique ou de mutations somaclonales induites par le passage en culture *in vitro*. Le phénotypage a porté sur la pomologie, la morphologie foliaire, le système de reproduction, sur la qualité des fruits et les composés d'arômes dans les feuilles. Pour ces derniers, deux cybrides entre le mandarinier "Willow Leaf" et le kumquat "Nagami" ont été étudiés, l'un possédant le noyau du kumquat et les organites

chloroplastiques et mitochondriaux du mandarinier et l'autre le noyau et les chloroplastes du kumquat avec les mitochondries du mandarinier. Des différences quantitatives dans la composition totale de certains composés aromatiques des feuilles des cybrides ont été observées avec une augmentation de 4 à 21 % (Fanciullino *et al.* 2005). Seul le premier cybride, avec le cytoplasme complet du mandarinier, a synthétisé plus de monoterpènes, de sesquiterpènes hydrocarbonés et d'alcools sesquiterpéniques comparé au parent kumquat. Cette surproduction est probablement liée à l'interaction noyau kumquat-chloroplaste mandarinier (Fanciullino *et al.* 2005). Un cybride "WLM + EUR" 2x entre mandarinier "Willow Leaf" et citronnier "Eureka" a été particulièrement étudié au cours de la thèse de Jean-Baptiste Bassène (2009). Ce cybride, d'un point de vue génétique, ne diffère du citronnier que par ses mitochondries de mandarinier. Il a été choisi car les parents citronnier et mandarinier présentent une différenciation phénotypique importante au niveau foliaire, floral, mais aussi sur des caractéristiques externes et internes du fruit. L'observation des caractères morphologiques, ne présente quasiment pas de différences significatives entre le citronnier et "WLM + EUR" 2x. Ainsi, la substitution de la mitochondrie du citronnier par celle du mandarinier n'aurait pas d'effet notable sur l'élaboration des caractères phénotypiques liés aux feuilles, aux fleurs et aux fruits. Il est également intéressant de noter que le taux de germination pollinique du cybride est similaire à celui du citronnier, 2,3 et 1,4 % respectivement, tandis que le mandarinier présente un taux de germination très nettement supérieur (73,7 %). La nouvelle interaction nucléo-mitochondriale n'a donc pas permis de restaurer la fertilité du citronnier. En effet, cette dernière serait d'origine nucléaire de type asynapsie et inductible par l'environnement (Pereau-Leroy 1951). Les seules différences significatives entre le cybride et le citronnier ont pu être observées pour le nombre d'étamines et l'épaisseur du limbe. Ces différences peuvent être liées aux interactions entre les génomes. En effet, les interactions nucléo-mitochondriales sont connues pour être à l'origine de variations phénotypiques chez différents cybrides, notamment pour leurs organes floraux (Farbos *et al.* 2001; Linke *et al.* 2003; Pelletier et Budar 2007; Teixeira *et al.* 2005). Le développement des fleurs ne dépend pas seulement de l'action d'un ensemble de gènes nucléaires, mais aussi d'une coordination avec l'action de la mitochondrie (Carlsson *et al.* 2008). La mitochondrie du mandarinier, génotype caractérisé par un faible nombre d'étamines, a probablement régulé l'expression de certains gènes nucléaires, conduisant à un nombre d'étamines significativement inférieur à celui du citronnier et intermédiaire aux deux parents. La différenciation observée au

niveau de l'épaisseur du limbe chez le cybride, épaisseur intermédiaire à celle des feuilles du citronnier et du mandarinier, peut être également associée à l'interaction entre le noyau et la mitochondrie. En revanche, le cybride présente un développement de son système végétatif tout à fait similaire au citronnier. Cela n'est pas le cas chez les cybrides de *Brassica*. En effet, Malik *et al.* (1999) et Leino *et al.* (2003) ont observé une réduction du développement végétatif lié aux interactions nucléo-mitochondriales chez des cybrides de *Brassica*.

L'influence de la mitochondrie sur la qualité du fruit a été également étudiée sur ce cybride de citronnier contenant la mitochondrie de mandarinier (Figure 17) (Bassene *et al.* 2008). Les variations qualitatives et quantitatives de l'acidité titrable et des différents composés : sucres, acides et caroténoïdes ont été analysées dans la pulpe des fruits du cybride au cours de la phase III de développement des fruits ainsi que chez les deux parents. Ce nouvel assemblage génétique semble affecter la composition de certains composants impliqués dans la qualité des fruits. En effet, au niveau de l'acidité titrable, le cybride présente un profil de citron renforcé, avec 0,94 meq g⁻¹ PF contre 0,8 meq g⁻¹ PF pour le citronnier. Ce résultat suggère que chez le citronnier, le changement des mitochondries par celle du mandarinier a eu un effet sur l'acidité. Dans le jus de citron, l'acidité titrable est connue pour être en grande partie due à l'acide citrique (Albertini *et al.* 2006), qui est l'acide organique majeur au stade de maturité. Ce résultat se retrouve également chez le cybride qui affiche des niveaux d'acide citrique plus élevés que le citronnier "Eureka". Le cycle de l'acide citrique se déroule dans la matrice des mitochondries des cellules à jus (Tucker 1993). Ainsi, la mitochondrie de mandarinier semble avoir augmenté la capacité du citronnier à produire des niveaux élevés d'acide citrique. Chez un mutant mitochondrial de *Nicotiana sylvestris*, Noctor *et al.* (2004) ont également observé une surproduction d'acide citrique en liaison avec la modification mitochondriale. Nous pouvons donc supposer que les nouvelles mitochondries sont la cause de la surproduction d'acides organiques dans la pulpe de fruit des cybrides. Toutefois, il est important de noter que lors de la phase d'hybridation somatique, le processus de régénération par embryogenèse somatique peut également induire des variations génétiques pouvant être responsables de changements phénotypiques mineurs (Orbovi *et al.* 2008).

La faiblesse des modifications entraînées au niveau phénotypique par la nouvelle interaction entre le génome nucléaire de citronnier et la mitochondrie du mandarinier, pourrait s'expliquer par une distance génétique entre les deux parents relativement faible. En effet, le

citronnier et le mandarinier, bien qu'appartenant à deux espèces différentes d'un point de vue botanique, sont sexuellement compatibles. Le génome nucléaire du citronnier, renferme par ailleurs une proportion importante d'allèles provenant du pool des mandariniers (Nicolosi *et al.* 2000). Les modifications phénotypiques les plus marquantes, sont généralement observées lors d'une relative incompatibilité entre les génomes nucléaires et mitochondriaux (Allen 2005; Hanson 1991). Cette incompatibilité pouvant apparaître suite à la formation de cybrides, entre des génotypes relativement éloignés (Allen 2005; Atienza *et al.* 2007; Hanson 1991), ou alors avec des réarrangements et/ou mutations cytoplasmiques (Allen 2005; Leino *et al.* 2003).

4.1.2.4. Analyse des variations du transcriptome entre le cybride "WLM + EUR" et le citronnier

Afin d'étudier les effets moléculaires associés à la nouvelle interaction nucléo-mitochondriale, la variation de l'expression globale des gènes entre "WLM + EUR" 2x et le citronnier "Eureka" a été analysée à l'aide des microarrays développés à l'IVIA dans le cadre du projet de génomique fonctionnelle des agrumes (CFGP; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>) ((Bassene 2009), Bassene *et al.*, en cours). L'analyse des profils d'expression des gènes à l'aide de microarrays a mis en évidence l'existence de modifications transcriptionnelles induites par la substitution de la mitochondrie du citronnier "Eureka" par celle du mandarinier "Willow Leaf". En effet, environ 2,5 % des 21081 gènes analysés montrent une modification de leur profil d'expression chez "WLM + EUR" 2x comparé au parent citronnier. Parmi les 519 gènes différentiellement exprimés, 480 sont surexprimés chez le cybride tandis que les 39 autres sont réprimés. Parmi les gènes surexprimés, les deux catégories fonctionnelles les plus représentées correspondent aux gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans le métabolisme (32%) et le métabolisme protéique (14%). Les catégories fonctionnelles correspondant aux gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans la "réponse au stress" (9%), le "transport" (7%), l'"organisation cellulaire" (7%), le "développement" (4%), la "transcription" (5%) et l'"énergie" (4%), sont moyennement représentées. Quand aux gènes réprimés, les deux catégories les plus représentées sont le "métabolisme des protéines" (6 gènes) et la "réponse au stress" (5 gènes) (Figure 18). Ce résultat montre que la présence de la mitochondrie du mandarinier chez le cybride influence l'expression d'un certain nombre de gènes nucléaires comme observé chez des alloplastes de

Gossypium hirsutum (Zhang *et al.* 2008) et *Brassica napus* (Carlsson *et al.* 2007). Cette régulation de l'expression des gènes nucléaires par le génome mitochondrial, appelé "retrograde signalling" (Butow et Avadhani 2004; Liu et Butow 2006; Rhoads et Subbaiah 2007), permet aux organelles de coordonner leur fonctionnement avec le noyau (Rhoads et Subbaiah 2007; Woodson et Chory 2008). La classification fonctionnelle des gènes, différenciellement exprimés, montre que la majorité d'entre eux interviennent principalement dans le métabolisme des protéines. Les analyses protéomiques et génomiques sur la localisation de séquences protéiques indiquent que les organelles pourraient contenir jusqu'à plusieurs milliers de protéines différentes. Toutefois, la majorité de ces protéines (93-99 %) sont codées dans le noyau, synthétisées dans le cytoplasme puis importées dans les organelles (Woodson et Chory 2008). Ceci peut expliquer le fait que la nouvelle interaction nucléo-mitochondriale provoque une modification des profils d'expression des gènes nucléaires intervenants dans le métabolisme des protéines en vue d'assurer le meilleur équilibre physiologique. Ainsi, certains gènes sont donc surexprimés pendant que d'autres sont réprimés en fonction de l'information reçue depuis la mitochondrie. Les gènes susceptibles d'intervenir dans la réponse au stress, sont également bien représentés parmi les gènes modulés. Certains de ces gènes destinés à réguler le niveau redox (glutathion transférases, catalases, ascorbate peroxydases, SOD) sont modulés chez le cybride.

Cette étude montre que, même si quasiment aucune modification phénotypique n'a été décrite au niveau des feuilles du cybride comparées à celles du citronnier, nous observons toutefois d'importantes modifications du transcriptome. Ces modifications jouent probablement un rôle dans la nouvelle construction cellulaire afin de pouvoir trouver une nouvelle homéostasie.

4.1.3. Conclusions et perspectives

Le travail sur le cybride ("WLM + EUR" 2x) a montré que la floraison n'était pas affectée par la nouvelle interaction nucléo-mitochondriale. En revanche, cette étude a permis de mettre à jour une surproduction d'acide citrique dans la pulpe des fruits comparée aux parents (Bassene *et al.* 2008). Une surproduction d'acide citrique en liaison avec une modification mitochondriale a été observée par Noctor *et al.* (2004) chez un mutant mitochondrial de *Nicotiana sylvestris* produisant plus de citrate et de malate que les non mutants. Ils en ont conclu que l'état redox de la mitochondrie a son importance dans la synthèse de ces métabolites primaires. Chez le mutant mitochondrial de *Nicotiana sylvestris* (CMS), Dutilleul *et al.* (2003) ont observé une

surexpression de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif : oxydase alternative (AOX), ascorbate peroxydase et superoxyde dismutase; l'induction de l'expression de catalases à la lumière; et aussi une forte activité NAD(P)H déhydrogénase, suggérant une augmentation de l'expression des gènes codant pour cette enzyme. L'analyse microarray du transcriptome de feuille de "WLM + EUR" 2x comparée au citronnier, révèle que plusieurs gènes susceptibles de coder pour des enzymes destinées à réguler le niveau redox (glutathion transférases, catalases, ascorbate peroxydases, SOD) sont modulés chez le cybride. De même, plusieurs gènes pouvant intervenir dans les voies métaboliques des sucres, des acides organiques ainsi que dans la photosynthèse, sont modulés (Bassene 2009).

Le métabolisme des sucres et des acides débute par la formation du saccharose produit dans les cellules du mésophylle puis exporté vers le phloème et transporté jusqu'aux organes non photosynthétiques comme les fruits (Taiz et Zeiger 1998). L'analyse du transcriptome des feuilles de "WLM + EUR" 2x montre une surexpression de gènes nucléaires impliqués dans le cycle de Calvin (ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase, ribulose-phosphate 3-epimerase, transketolase, fructose-bisphosphate aldolase) producteur des trioses phosphates à partir desquels est synthétisé le saccharose. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un approvisionnement plus important en saccharose des fruits du cybride pourrait être compensé par une glycolyse plus importante, maintenant des teneurs en sucres similaires au citronnier et conduisant aux teneurs plus élevées en acide citrique. En effet, dans le cytoplasme des cellules des sacs à jus, le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose. Ces derniers, *via* la glycolyse, donne du pyruvate et du phosphoenolpyruvate servant de précurseur à la synthèse des acides organiques, notamment l'acide citrique, dans les matrices mitochondriales des cellules à jus à travers le cycle de Krebs (Sinclair 1984; Tucker 1993).

De plus, plusieurs auteurs ont montré que le saccharose stimule la synthèse et l'accumulation des caroténoïdes avec une surexpression du gène *PSY1* codant pour la phytoène synthase (Iglesias *et al.* 2001; Télef *et al.* 2006). D'après Carol et Kuntz (2001), la synthèse des caroténoïdes serait pilotée par le statut redox. Cela laisse supposer qu'une modification d'apport en sucres dans les fruits pourrait modifier l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes *via* une variation de la glycolyse et du statut redox.

Le Cirad possède, en Corse, différentes combinaisons de cybrides. L'ensemble des cybrides se trouve dans une parcelle homogène dans un dispositif randomisé avec leurs parents et chacun sur deux porte-greffes et quatre répétitions. Plusieurs cybrides présentent seulement les mitochondries du mandarinier "Willow Leaf" combinées avec le reste du génome (nucléaire et chloroplastique) du pomelo, de l'oranger et du kumquat, en plus du citronnier "Eureka". De plus, deux cybrides sont issus de la combinaison du cytoplasme de mandarinier avec le génome du pomelo "Duncan" (jaune sans lycopène) et du pomelo "Star Ruby" (rose avec lycopène).

Afin de valider les variations phénotypiques observées précédemment chez le cybride "WLM + Eur" 2x, il serait intéressant d'étudier la cinétique des sucres et acides organiques sur les fruits des différents cybrides disponibles, au cours de leur maturité.

De plus, il sera intéressant de réaliser une étude phénotypique de la croissance, de la photosynthèse et du statut redox chez ceux-ci. L'objectif sera d'analyser la croissance des cybrides comparativement à leurs parents et d'étudier les variations de photosynthèse et de statut carboné (vitesse et durée de croissance, efficacité de l'appareil photosynthétique).

Le laboratoire de biochimie de Corté et la SRA ont mis en place un cadre d'analyse permettant d'étudier le stress oxydatif et l'acclimatation aux stress avec l'analyse des enzymes antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase, des antioxydants primaires (ascorbate, glutathion par spectrométrie et tocophérols par HPLC (High Performance Liquid Chromatography)) et secondaires (analyses des caroténoïdes par HPLC, analyse des flavonoïdes par des mesures de fluorescence).

Enfin, une étude globale du transcriptome par microarray des cybrides comparés à leurs parents (nucléaire) permettra d'appréhender le rôle des mitochondries ainsi que celui des chloroplastes dans l'expression génomique. L'analyse globale du transcriptome par microarray sera complétée par les études de PCR en temps réel pour plusieurs gènes susceptibles de coder pour des enzymes destinées à réguler le niveau redox (glutathion transférases, catalases, ascorbate peroxydases, superoxyde dismutase (SOD)).

Ce travail dont le dispositif expérimental est particulièrement innovant (substitution de différentes mitochondries ou de différents cytoplasmes) apportera des informations particulièrement intéressantes sur l'impact génomique et phénotypique des interactions nucléo-

cytoplasmiques. Ce travail permettra de mieux appréhender l'intérêt de la cybridisation pour l'amélioration des agrumes.

4.2 Les hybrides somatiques tétraploïdes

4.2.1. Expression phénotypique et génomique chez des tétraploïdes issus d'hybridation somatique

4.2.1.1. La polyploïdisation

Il existe différents processus aboutissant à des individus polyploïdes. Généralement, on distingue d'un point de vue génétique les auto- et les allo-polyploïdes. Les autopolyploïdes résultent d'un doublement spontané ou induit du génome de base.

Les allopolyploïdes sont des individus polyploïdes ayant un génome issu de la combinaison de deux à plusieurs génomes différents. Cette polyploïdisation peut être naturelle ou artificielle. Dans le cas d'une allopolyploïdisation naturelle, différents mécanismes peuvent intervenir lors des croisements sexués. En effet, il peut y avoir un doublement du lot chromosomique après un croisement entre espèces génétiquement éloignées (Figure 19a), une fécondation entre un ovule et un gamète mâle tous deux non réduits (Figure 19b) et enfin un croisement entre deux autotétraploïdes (Figure 19c). La polyploïdisation « artificielle » est réalisée par fusion de protoplastes. Elle peut aboutir à des allopolyploïdes mais également à des autopolyploïdes. On parle également d'hybrides polyploïdes synthétiques lorsque l'on cherche à recréer une espèce polyploïde à partir des génomes parentaux.

La polyploïdie est reconnue comme une composante majeure dans l'évolution des eucaryotes particulièrement chez les angiospermes (Soltis et Soltis 1993; Soltis *et al.* 2004). On estime que 30 à 70 % des espèces végétales sont d'origine polyploïde (Masterson 1994; Wolfe 2001). Les études effectuées à l'aide de marqueurs moléculaires, de la GISH (hybridation génomique *in situ*) et de la cartographie génétique ont permis l'identification de nouvelles espèces polyploïdes et l'analyse du rôle prépondérant de la polyploïdie dans l'évolution des génomes des plantes supérieures (Soltis et Soltis 1993; Soltis *et al.* 2004). En effet, il apparaît, aujourd'hui, que la plupart des plantes à fleurs et peut-être même tous les eucaryotes possèderaient des génomes constitués de nombreux gènes redondants, lesquels seraient issus des phénomènes de polyploïdisation (Soltis *et al.* 2004). Des études récentes sur diverses espèces

polyploïdes ont apporté des informations sur la manière dont les génomes polyploïdes évoluent après leur formation, sachant que la plupart des polyploïdes sont très anciens et leurs géniteurs exacts méconnus (Chen 2007). Les travaux sur des polyploïdes synthétiques ont permis de voir que des changements génétiques et épigénétiques très importants survenaient, parfois très rapidement, après à la polyploïdisation (Comai 2000; Leitch et Bennett 1997). De plus, la polyploïdisation engendre l'apparition de phénotypes intermédiaires aux parents mais aussi de phénotypes tout à fait nouveaux suggérant une expression non additive des gènes. Grâce au développement de nouvelles technologies de biologie moléculaire (analyses microarray, méthylation-sensitive AFLP (MSAP), cDNA-SSCP...), il est à présent possible d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes intervenant dans l'expression génomique et phénotypique chez les polyploïdes.

4.2.1.2. Les modifications génétiques liées à la polyploïdisation

Des modifications génétiques peuvent apparaître très rapidement après la polyploïdisation. Celles-ci peuvent se traduire par des réarrangements et des transpositions chromosomiques ainsi que par des éliminations de séquences génomiques spécifiques (Feldman *et al.* 1997; Tate *et al.* 2006). Grâce au marquage chromosomique (FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) et GISH), un nombre important de réarrangements chromosomiques chez des allopolyploïdes de *Nicotiana tabacum*, *Avena maroccana* ont pu être identifiés (Leitch et Bennett 1997; Wendel 2000). Toutefois, de récentes observations suggèrent que les réarrangements chromosomiques ne seraient pas une règle générale chez les polyploïdes car chez certains polyploïdes tels que le coton, aucun exemple de réarrangement n'a été observé (Hegarty et Hiscock 2008).

4.2.1.3. Les modifications épigénétiques liées à la polyploïdisation

Il est aujourd'hui démontré que le rôle des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification des histones, dominance nucléolaire, éléments transposables ...), n'est pas négligeable, concernant l'expression génétique des génomes polyploïdes (Comai 2000; Osborn *et al.* 2003).

La régulation épigénétique de l'expression des gènes, chez les organismes polyploïdes, par le biais de méthylation des cytosines a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années (Comai 2005; Hegarty et Hiscock 2008). Les études sur des allopolyploïdes synthétiques d'*A.*

suecica ont mis en évidence des "silencing" d'origine épigénétique portant sur 2,5 % des gènes (Lee et Chen 2001). La plupart de ces modifications ont été associées à des altérations de la méthylation des cytosines sur des sites spécifiques, ainsi qu'à des altérations de la structure de la chromatine (Comai 2000). Chez *Spartina* l'hybridation interspécifique entre *S. alterniflora* et *S. maritima* conduit à une modification des profils de méthylation de 30% par rapport aux profils parentaux (Salmon *et al.* 2005). Il apparaît que le reformatage épigénétique n'est pas aléatoire puisque des événements indépendants d'hybridation conduisent à de fortes similarités des régions affectées par la méthylation du génome (Adams *et al.* 2004; Salmon *et al.* 2005).

Une autre constatation faite chez les polyploïdes néo-synthétisés, est que l'hybridation pourrait se traduire par l'activation généralisée des éléments transposables en raison de l'instabilité du nouveau génome. Nous pouvons citer en exemple l'étude de Madlung *et al.* (2005) qui utilisent des "microarrays" d'*Arabidopsis* couvrant une région hétérochromatique du chromosome 4 contenant de multiples transposons. Ils ont observé une activation de certains transposons chez l'allopolyploïde comparé aux parents (Madlung *et al.* 2005).

L'expression des gènes dupliqués par la polyploïdie peut être variable dans différentes parties de la plante, ce qui indique une régulation différentielle des gènes homoéologues au cours du développement de celle-ci. Ce processus, connu sous le nom de "subfonctionalisation", a été proposé comme un mécanisme pouvant permettre aux gènes dupliqués d'être maintenus dans les génomes polyploïdes (Kellogg 2003). Cette 'subfonctionalisation' des gènes dupliqués est un aspect important de la polyploïdisation. Elle conférerait aux polyploïdes un avantage adaptatif immédiat. Elle expliquerait par ailleurs leur conservation dans une proportion relativement élevée. En effet, il est généralement admis qu'à partir du moment où un gène est dupliqué, il va, soit évoluer vers une nouvelle fonction, soit être supprimé par délétion ou formation d'un pseudogène. La fréquence des gènes dupliqués conservés apparaît toutefois beaucoup plus élevée que la probabilité pour ces mêmes gènes d'avoir acquis une nouvelle fonction avant d'être perdus. Rapp et Wendel (2005) proposent que la "subfonctionalisation" préserverait les gènes dupliqués et les garderait ainsi disponibles pour l'acquisition de nouvelles fonctions à long terme.

4.2.2. Expression phénotypique et génomique chez les hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes

L'hybridation somatique permet de combiner l'ensemble des génomes nucléaires de deux génotypes quel que soit leur degré d'hétérozygotie et sans qu'il n'y ait de méiose. Cet outil est original pour la compréhension des règles de transmission des caractères phénotypiques chez les allopolyploïdes synthétiques. Chez les agrumes, des évaluations sont en cours pour plusieurs hybrides interspécifiques et intergénériques, dans le but de comprendre les mécanismes gouvernant cette hérédité au niveau des génomes allopolyploïdes (Grosser et Chandler 2004; Grosser *et al.* 2007; Guo *et al.* 2004b; Ollitrault *et al.* 2007b). Les premières évaluations agronomiques suggèrent que les hybrides somatiques sont généralement plus vigoureux que les diploïdes doublés. En revanche, certaines caractéristiques des hybrides somatiques semblent liées à la tétraploïdie. Ainsi, les hybrides somatiques allotétraploïdes et les autotétraploïdes utilisés comme porte-greffes confèrent généralement une croissance réduite de la variété, comparés à leurs parents diploïdes (Grosser *et al.* 2000; Lee *et al.* 1990). De même, des travaux réalisés par Grosser *et al.* (2007) montrent une amélioration de la tolérance aux nématodes chez les hybrides somatiques et les diploïdes doublés. Les résultats récemment obtenus par le Cirad (Mouhaya *et al.* Soumis; Saleh *et al.* 2008) sur la tolérance aux stress hydrique et salin suggèrent que l'état tétraploïde confère une meilleure tolérance. Il faut aussi signaler que la tolérance à la tristezza du *Poncirus* est transmise de manière dominante chez ces hybrides somatiques (Ollitrault *et al.* 2000b). Il en est de même pour la tolérance aux *phytophthora* sp. (Grosser *et al.* 2000).

4.2.2.1 Transmission de la morphologie foliaire, florale

Chez un hybride somatique mandarinier + citronnier

La comparaison du phénotype de l'hybride somatique mandarinier "Willow Leaf" x citronnier "Eureka" à celui de ses parents a contribué à la compréhension et à la détermination des phénomènes d'expression additive ou non des gènes.

Concernant le phénotype foliaire, l'allotétraploïde ressemble au parent citronnier sur de nombreux caractères. En effet, les mesures effectuées sur la surface, la largeur des feuilles ainsi que la forme et l'épaisseur du limbe indiquent des valeurs proches voir quasi identiques à ce dernier (Tableau 5). Seule la longueur foliaire est intermédiaire aux parents.

De même, l'appareil floral de l'hybride somatique est proche du parent citronnier ou intermédiaire aux deux (Figure 20). On constate une dominance du citronnier en ce qui concerne le nombre, la longueur et la largeur des pétales. En revanche, le nombre d'étamines, le taux de fleurs hermaphrodites et mâles, le taux de germination du pollen et la coloration des pétales présentent un profil intermédiaire (Tableau 6). Ces caractéristiques phénotypiques intermédiaires aux géniteurs sont souvent observées chez les hybrides somatiques allotétraploïdes (Collonnier *et al.* 2003; Fock *et al.* 2007) et notamment chez les agrumes (Grosser *et al.* 2007; Grosser *et al.* 1996a; Ohgawara *et al.* 1991). Ainsi, la morphologie des feuilles, des fleurs et d'autres organes sert généralement de marqueur pour l'identification des hybrides (Grosser et Gmitter 1990; Zhou *et al.* 2001). Les caractères morphologiques de "WLM + EUR" 4x, intermédiaires à ceux du citronnier et du mandarinier, témoignent d'une co-expression des génomes du mandarinier et du citronnier. Dans l'ensemble, certains caractères morphologiques affichés par "WLM + EUR" 4x suggèrent une expression additive des gènes. Cependant, des phénomènes de dominances ont été observés pour un certain nombre d'autres caractères, avec dans l'ensemble une dominance plus marquée des caractères du citronnier. Ces observations suggèrent une expression non additive de certains gènes. La dominance de l'un ou de l'autre parent, en fonction des caractères, est également observée chez des hybrides de *Solanum* et de *Nicotiana*. Menke *et al.* (1996) ont décrit, chez les hybrides allotétraploïdes entre *Solanum pinnatisectum* et *S. tuberosum*, des tubercules très similaires à ceux de *S. tuberosum* à l'inverse de la morphologie des feuilles, intermédiaire aux deux parents. De même pour les résultats de Sun *et al.* (2007) qui constatent que les hybrides allotétraploïdes entre *Nicotiana glauca* et *N. tabacum* ont des fleurs similaires à celles de *N. tabacum*.

Dans un diallèle

La description de la morphologie des feuilles (longueur, largeur et épaisseur du limbe) est en cours de réalisation sur un dispositif diallèle comprenant cinq parents (mandarinier commun, citronnier "Apireno Continella" (CAC), pomelo "Star Ruby", oranger "Shamouti" et limettier "Mexicain" (LM)) et neuf hybrides somatiques (absence de l'hybride CAC+LM). Tout comme chez l'hybride somatique mandarinier + citronnier, la majorité des hybrides somatiques présentent les caractéristiques phénotypiques foliaires comprises dans la gamme des parents. Toutefois, on peut noter que chez tous les hybrides contenant le limettier "Mexicain", la longueur

et la largeur du limbe sont inférieures aux deux parents (nos résultats, en cours). Ainsi, les hybrides polyploïdes peuvent donner naissance à des phénotypes intermédiaires aux deux parents, mais également à de nouveaux phénotypes au-delà de la contribution des parents, suggérant respectivement une expression additive et non additive des gènes (Chen 2007). Il est avéré, que la combinaison de deux génomes distincts peut provoquer de vastes modifications structurelles et fonctionnelles dont les mécanismes sont encore mal compris (Albertin *et al.* 2007; Marmagne *et al.* 2010). Ces modifications sont à l'origine d'hérités non additives chez les plantes allopolyploïdes, et peuvent conduire à l'apparition de phénotypes nouveaux, absents chez les diploïdes parentaux et sortant des gammes de variabilité des espèces originelles.

4.2.2.2. Transmission des déterminants de la qualité chez les agrumes

De nombreuses études ont porté sur la transmission des déterminants de la qualité chez les hybrides somatiques d'agrumes. La majorité de ces travaux ont été réalisés sur les composés aromatiques des feuilles (Alonzo *et al.* 2000; Gancel *et al.* 2002; Gancel *et al.* 2003, 2005a, b) et des polyphénols de la pulpe des fruits (Tusa *et al.* 2007). Les résultats témoignent d'une variabilité assez importante dans le profil des hybrides comparé à celui de leurs parents. Les auteurs concluent généralement que l'hybridation somatique n'entraîne pas une simple addition des différents caractères parentaux (Gancel *et al.* 2003, 2005a; Tusa *et al.* 2007). Gancel *et al.* (2005b) mentionnent ainsi une diminution généralisée de la biosynthèse de sesquiterpénoïdes dans les feuilles de treize hybrides somatiques, interspécifiques et intergénériques. Des phénomènes de dominance ont pu être observés pour certains hybrides, tandis que pour d'autres aucune dominance n'a pu être établie. Ainsi, Gancel *et al.* (2003, 2005a) ont montré que les hybrides somatiques combinant le génome du mandarinier "Willow Leaf" avec ceux de la lime, des citronniers "Eureka" et "Lac", de l'orange douce, de pomelo, de kumquat, de *Poncirus*, exhibent un profil de composés aromatiques de feuille plus proche du mandarinier. En revanche, sur une autre étude portant sur les huiles essentielles de six hybrides somatiques, résultants de combinaisons entre le limetier, le citronnier, le cédratier, l'oranger et le pomelo, aucune dominance n'a été clairement observée (Gancel *et al.* 2005b). Les résultats sur les composés aromatiques du zeste du fruit sont similaires chez un hybride mandarinier + citronnier. La composition est plus proche de celle des fruits du mandarinier, avec toutefois un effet non négligeable du parent citronnier.

La transmission des caractères impliqués dans la qualité du fruit a été particulièrement étudiée chez un hybride interspécifique entre mandarinier "WillowLeaf" et citronnier "Eureka", appelé "WLM + EUR" 4x (Figure 21) (Bassene *et al.* 2009a). Cet hybride somatique montre un profil très proche du parent citronnier pour la synthèse des acides organiques, et proche du parent mandarinier pour les teneurs en fructose. Les concentrations en saccharose et en glucose de la pulpe des fruits de "WLM + EUR" 4x sont intermédiaires aux deux parents (Bassene *et al.* 2009a). Concernant la teneur en caroténoïdes dans la pulpe du fruit, le citronnier contient très peu de caroténoïdes avec de très faibles teneurs en β -carotène et β -cryptoxanthine tandis que de fortes concentrations en β -cryptoxanthine mais également en phytoène, phytofluène, β -carotène, lutéine, zeaxanthine et violaxanthine sont observées pour le mandarinier. La teneur totale des caroténoïdes contenue dans les sacs à jus du mandarinier est 60 fois supérieure à celle du citronnier. L'hybride allotétraploïde produit tous les composés de la mandarine, mais à des concentrations beaucoup plus faibles (~10 fois moins) (Bassene *et al.* 2009b). Seule l'acide absicique (ABA), dernier composé de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, est produit en quantité supérieure aux deux parents chez l'hybride somatique. Cette surproduction d'ABA est une caractéristique des tétraploïdes, laissant ainsi penser qu'elle serait davantage liée à la tétraploïdie qu'à l'hybridation (nos résultats, Morillon, communication personnelle). Enfin, sur les polyphénols de la pulpe des fruits, Tusa *et al.* (2007) ont observé que le profil métabolique de l'hybride somatique entre l'oranger "Valencia" et le citronnier "Femminello" occupe une position intermédiaire à celle des parents, avec une légère dominance du génome du citronnier.

Ainsi, les travaux menés sur l'hérédité des composés aromatiques des feuilles (Alonzo *et al.* 2000; Gancel *et al.* 2002; Gancel *et al.* 2003, 2005a, b), des polyphénols de la pulpe (Tusa *et al.* 2007), des acides organiques, des sucres et des caroténoïdes de la pulpe (Bassene *et al.* 2009a; Bassene *et al.* 2009b), dans le cadre de l'hybridation somatique chez les agrumes, témoignent de la difficulté de prédiction des profils des hybrides en fonction de celui de leurs parents. Ces composés ne sont pas hérités de manière additive chez l'hybride allotétraploïde et peuvent, selon les cas, présenter une dominance de l'un ou l'autre parent. Les différents auteurs en concluent que l'hybridation somatique n'est pas due à une simple addition des différents caractères parentaux (Bassene *et al.* 2009a; Bassene *et al.* 2009b; Gancel *et al.* 2003; Tusa *et al.* 2007). De tels phénomènes de dominance ont également été observés plus largement chez les hybrides allotétraploïdes entre *Arabidopsis thaliana* et *A. arenosa*. Ceux-ci, malgré une morphologie

souvent variable, sont caractérisés par leur grande ressemblance morphologique avec le parent *A. arenosa* (Comai 2000; Madlung *et al.* 2002). Les auteurs parlent d'une dominance morphologique d'*A. arenosa* sur *A. thaliana*.

4.2.2.3. Régulation non additive de l'expression des gènes chez l'hybride somatique tétraploïde citronnier + mandarinier

Les plantes polyploïdes présentent parfois de nouveaux phénotypes, sortant de la fourchette de variabilité du pool génique diploïde. Chez les agrumes, les programmes d'hybridation somatique ont permis la production de plusieurs centaines d'hybrides somatiques interspécifiques et intergénériques allotétraploïdes. Ces génotypes représentent des modèles intéressants pour étudier les effets immédiats de l'allopolypléidisation sur la régulation de l'expression des gènes. Les premiers travaux, portant sur l'expression du protéome par électrophorèse bidimensionnelle, ont montré des modifications très importantes chez un hybride somatique interspécifique mandarine + lime (*C. deliciosa* + *C. aurantifolia*), et sur un hybride somatique intergénérique mandarine + kumquat (*C. deliciosa* + *Fortunella margarita*). La modification de l'expression des gènes chez les deux hybrides somatiques par rapport à leurs parents est globalement très forte. Les analyses mettent à jour des phénomènes de "silencing" sur de nombreux spots, affectant plus particulièrement ceux des parents "lime" et "kumquat". Ainsi, près de 75% des spots spécifiques de ces parents sont éteints chez les hybrides. Ils ont noté également l'apparition de nombreux nouveaux spots, 14% pour l'hybride mandarine + lime et 29% pour l'hybride mandarine + kumquat, dont cinq communs aux deux hybrides (Gancel *et al.* 2006). Afin de vérifier si les caractères phénotypiques de l'hybride somatique allotétraploïde "WLM + EUR" 4x, généralement compris dans l'intervalle des deux parents et marqués par une coexistence de caractères dominants, codominants et transgressifs, sont associés à une expression non additive des deux génomes diploïdes parentaux, l'expression globale des gènes a été analysée à partir du transcriptome de la pulpe des fruits de l'hybride allotétraploïde et de ses parents. L'étude a été effectuée par hybridation du transcriptome sur un microarray d'ADNc de 20 K, constitué de 21081 unigenes. Ce dernier a été développé dans le cadre du projet de génomique fonctionnelle des agrumes (CFGP; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>) à partir d'une large base d'ESTs (expressed sequence tags) clémentinier. Selon l'hypothèse de l'additivité, les allopolypléïdes nouvellement synthétisées sont censés présenter un profil d'expression identique

au parent moyen. Il ressort que 4% du transcriptome de "WLM + EUR" montre une divergence entre les deux parents avec 212 et 160 gènes surexprimés chez *C. reticulata* et *C. limon* respectivement. Ce chiffre est inférieur aux 15% observés par Wang *et al.* (2006) lors d'une étude du transcriptome de feuilles entre *Arabidopsis thaliana* et *A. arenosa* ou aux 10% de divergence observés entre les lignées de maïs (Swanson-Wagner *et al.* 2006). Des déviations de l'additivité ont également été trouvées dans des allopolyploïdes synthétiques de *Senecio* (Hegarty *et al.* 2006), *Brassica* (Albertin *et al.* 2006), *Triticum* (He *et al.* 2003) et *Gossypium* néo-polyploïdes (Flagel *et al.* 2008), suggérant que la régulation différentielle de l'expression génique est une caractéristique commune des plantes allopolyploïdes. En fait, au regard des différents résultats, cette hypothèse d'additivité n'est donc pas valable. La majeure partie des gènes, montrant une différenciation interspécifique d'expression entre le mandarinier et le citronnier, présente un profil d'expression non additif chez l'hybride allotétraploïde "WLM + EUR" 4x, et la plupart d'entre eux sont réprimés. Cette régulation négative a également été observée chez des hybrides interspécifiques de tournesol (Lai *et al.* 2006). Ce comportement non additif de l'expression différentielle parental et la répression doivent être associés à l'interspécificité et la divergence parentale, qui entraînent des régulations d'incompatibilités (Landry *et al.* 2007).

Nous avons également observé que la quasi-totalité des gènes sous-exprimés chez le mandarinier comparé au citronnier sont réprimés chez l'allotétraploïde "WLM + EUR". Toutefois, lorsque les gènes sont surexprimés chez le mandarinier par rapport au citronnier, les expressions des gènes de l'allotétraploïde ont une distribution beaucoup plus équilibrée de part et d'autre de la valeur du parent moyen, avec la présence de cas de surexpression transgressive. Ces résultats indiquent une forte dominance du transcriptome du mandarinier sur celui du citronnier. Une telle dominance du transcriptome a également été démontrée chez les hybrides allotétraploïdes entre *Arabidopsis arenosa* et *A. thaliana*. En effet, Wang *et al.* (2006) ont observé que les gènes plus fortement exprimés chez les autotétraploïdes d'*A. thaliana* que chez *A. arenosa*, sont soumis à une répression chez les allotétraploïdes synthétiques. Considérant la valeur du parent moyen entre ces deux lignées allotétraploïdes, 97% des gènes surexprimés chez *A. thaliana* ont été réprimés tandis que seulement 47% des gènes surexprimés chez *A. arenosa* ont été réprimés. Ainsi, quand deux noyaux se combinent en un seul lors de l'hybridation, l'organisme peut «choisir» un ensemble de gènes codant pour des ARNm, tandis que d'autres sont soumis à un "silencing". On parle alors de dominance nucléolaire. Cette dominance d'un

transcriptome a également été signalée dans deux études récentes sur le coton (*Gossypium hirsutum* L.), et a mis en évidence la domination d'un transcriptome de l'un ou l'autre parent, selon l'organe analysé. Le coton a été formé par hybridation interspécifique entre des anciennes espèces de génome AA et BB. Dans une étude microarray de tissu ovulaire, Yang *et al.* (2006) ont démontré que les gènes du sous-génome AA ont été enrichis tandis que dans une étude de tissus de pétales, Flagel *et al.* (2008) ont observé que la dominance pouvait s'exprimer ou non différemment dans certains tissus ou à certains stades de développement. Elle serait une conséquence probable de la subfonctionnalisation des gènes dupliqués (Lynch et Force 2000).

4.2.2.4. Une expression non additive du transcriptome concordante avec l'absence de codominance pour l'hérédité de nombreux caractères phénotypiques chez les allopolyploïdes

L'étude de l'expression par PCR en temps réel des gènes de la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes, dans la pulpe des fruits, fait également ressortir l'existence d'une nouvelle forme de régulation chez l'allotétraploïde. En effet, la majorité des gènes présentent un profil d'expression non additif concordant avec l'analyse globale du transcriptome par microarray. On note, cependant, une dominance de la faible expression du citronnier sur le profil d'expression des gènes présents en amont de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (*CitDxs*, *CitZds* et *CitLcy-b*), et une dominance du mandarinier sur l'étape clé de formation des β,β -xanthophylles (*CitHy-b*). De plus, *CitNced*, responsable du catabolisme des caroténoïdes en faveur d'une production d'ABA, montre une surexpression transgressive. Ces profils d'expression sont bien corrélés aux résultats phénotypiques observés chez l'hybride allotétraploïde correspondant à des fruits contenant l'ensemble des caroténoïdes trouvés chez le mandarinier mais à de faibles concentrations. La combinaison des génomes du citronnier et du mandarinier a permis de nouvelles interactions alléliques à l'origine de ce phénotype particulier.

4.3. Conclusions et perspectives

La comparaison des feuilles, des fleurs et des fruits entre l'hybride allotétraploïde ("WLM + EUR" 4x) et ses parents permet de décrire une grande variabilité dans l'hérédité des caractères phénotypiques liés à l'interaction entre les génomes du mandarinier et du citronnier. La majorité

des caractères phénotypiques observés présentent une dominance de l'un ou l'autre des parents tandis que certains montrent une codominance.

L'analyse globale du transcriptome de la pulpe par microarray (ADNc de 20K) met en évidence une fréquence relativement élevée d'expression génomique non additive chez "WLM + EUR" 4x, en concordance avec les différentes observations de dominances observées aux niveaux morphologiques et biochimiques. Une dominance globale du transcriptome de mandarinier a par ailleurs été observée, liée à la répression quasi systématique de l'expression chez l'hybride somatique des gènes sous-exprimés chez le mandarinier en comparaison du citronnier. Par la suite, il serait intéressant d'étudier le transcriptome des différents organes de l'allotétraploïde afin de déterminer si l'expression non additive est similaire dans chacun d'entre eux. Il serait intéressant de pouvoir étudier les mécanismes de régulation de l'expression chez l'hybride allotétraploïde pour comprendre le phénomène de dominance ou de répression alternée des gènes homéologues. Chez les allotétraploïdes d'*Arabidopsis*, il a été montré que la répression spécifique du transcriptome d'*A. thaliana* est la conséquence d'un phénomène épigénétique de dominance nucléolaire marquée par le "silencing" des gènes ARN ribosomiaux (ARNr) du génome d'*A. thaliana* (Chen *et al.* 1998; Lee et Chen 2001). Celui-ci se traduit en grande partie par l'absence d'expression des copies de gènes d'*A. thaliana* dans les hybrides en raison de l'inactivité de sa machinerie traductionnelle. Des reformatages de la méthylation du génome, l'acétylation des histones, l'activation d'éléments transposables, ainsi que l'action des siRNA et miRNA (Chen 2007) ont également été décrits comme autant de mécanismes conduisant au "silencing" de certains gènes.

Enfin, il serait également intéressant d'étendre cette étude à une gamme élargie d'hybrides somatiques. En effet, le phénotypage de croisements diallèles d'hybrides somatiques et des espèces parentales a mis en évidence un effet nanisant des feuilles et des fruits pour tous les hybrides ayant pour parents la lime mexicaine. L'étude du transcriptome permettrait de vérifier, si la dominance du transcriptome du mandarinier pour les gènes sous-exprimés chez le mandarinier, s'avère systématique, et de déterminer le poids du génome de limettier dans ce dispositif diallèles. Cette étude du transcriptome pourrait être très utile pour la prédiction du phénotype des hybrides somatiques.

5. CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de ces dix dernières années, de nombreuses avancées ont pu être réalisées tant d'un point de vue « recherche appliquée » que « recherche cognitive ». Ces avancées sont le fruit du travail d'une équipe, comprenant des chercheurs, des thésards, des techniciens, de très nombreux stagiaires, des mains d'œuvres occasionnelles et des partenaires.

Concernant le projet d'innovation variétale de fruits d'épluchage facile type mandarines/clémentines, des milliers d'hybrides triploïdes ont été créés. Ce matériel est en phase d'évaluation en Corse, mais également dans le bassin méditerranéen, en zone tropicale humide et en Amérique du Sud. Un énorme travail de phénotypage a débuté. Le développement de la technologie Nirs sur des populations hybrides devrait permettre d'accélérer ce phénotypage de manière non destructive. Du matériel végétal a déjà été sélectionné et fait actuellement l'objet d'une demande de certificat d'obtention variétale.

Concernant notre projet de recherche, des avancées ont été réalisées dans le domaine des origines génétiques des espèces cultivées, de la gestion de la ploïdie et de la structure génétique des gamètes diploïdes et de l'expression phénotypique et génotypique chez des hybrides somatiques diploïdes et tétraploïdes.

L'avancée la plus notable en terme d'étude de l'origine des agrumes cultivés est la distinction de cinq mitotypes au sein du genre *Citrus* à l'aide de marqueurs mitochondriaux dont deux dans le groupe des mandariniers : les doux et les acides. Ce sont ces derniers qui seraient les géniteurs maternels de nombreux porte-greffes tels que la lime "Rangpur", "Rough lemon" et "Volkameriana".

Des progrès ont été également réalisés dans la gestion de la ploïdie. Aujourd'hui, nous nous efforçons de connaître la structure génétique des gamètes diploïdes à l'origine des génomes triploïdes dans les différentes stratégies de création. Couplé au phénotypage, nous tenterons d'évaluer le poids du gamète sur le phénotype.

Des avancées significatives ont été établies dans l'étude de l'expression phénotypique et génomique des hybrides somatiques. Nous avons montré que les cybrides présentent peu de variation phénotypique. Cela souligne l'intérêt des cybrides en amélioration des agrumes en particulier pour le transfert de caractères contrôlés par le cytoplasme comme la stérilité mâle cytoplasmique, présente chez les mandariniers Satsuma, ou des résistances aux contraintes

biotiques et abiotiques aussi bien au niveau des porte-greffes qu'au niveau variétal. Chez les allotétraploïdes, la transmission du phénotype est complexe, généralement comprise entre les valeurs parentales et ne peut être traitée comme une simple additivité. L'analyse globale du transcriptome de la pulpe par microarray de l'hybride allotétraploïde comparé aux parents nous ont permis de mettre en évidence une fréquence relativement élevée d'expression génomique non additive chez l'hybride somatique en concordance avec les différentes observations de dominances observées aux niveaux morphologiques.

Le séquençage complet du génome du clémentinier, au delà de son intérêt cognitif en termes d'évolution, revêt un caractère appliqué par le développement d'outils d'analyse à haut débit. Le reséquençage partiel du génome de différents agrumes devrait permettre d'identifier de nombreux marqueurs génétiques répartis sur tout le génome. Au travers des puces à ADN, ces marqueurs devraient être très utiles pour l'identification de régions d'intérêt, notamment celles responsables de la qualité des fruits, du rendement et de la résistance à certaines maladies. Grâce à la connaissance de ces régions, et dans certains cas de ces gènes, un profil génétique des individus pourra être facilement établi. Le travail de l'améliorateur pourrait, dans un futur relativement proche, consister alors à choisir des géniteurs sur la base de leur valeur génétique prédite à partir de ces marqueurs.

Pour conclure, je tiens à remercier tous les partenaires avec qui nous avons développé des projets. Grâce à l'Ivia, nous avons eu accès à la puce microarray, qui nous été fort utile dans l'étude de la transcription. Grâce à DAK, nous évaluons actuellement des milliers de triploïdes en zone méditerranéenne. Avec l'Université, nous avons bénéficié de leurs connaissances en biochimie et composées des arômes chez les agrumes. Avec l'Université du Chili, un projet d'amélioration des petits fruits débute... Avec mes collègues des différentes unités du Cirad et de l'Inra avec qui nous échangeons constamment...

REFERENCES :

- Adams KL, Percifield R, Wendel JF (2004) Organ-specific silencing of duplicated genes in a newly synthesized cotton allotetraploid. *Genetics* 168:2217-2226
- Albertin W, Alix K, Balliau T, Brabant P, Davanture M, Malosse C, Valot B, Thiellement H (2007) Differential regulation of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids is not related to protein function nor subcellular localization. *BMC Genomics* 8:(21 February 2007)
- Albertin W, Balliau T, Brabant P, Chevre AM, Eber F, Malosse C, Thiellement H (2006) Numerous and rapid nonstochastic modifications of gene products in newly synthesized *Brassica napus* allotetraploids. *Genetics* 173:1101-1113
- Albertini MV, Carcouet E, Pailly O, Gambotti C, Luro F, Berti L (2006) Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:8335-8339
- Aleza P, Cuenca J, Juarez J, Pina JA, Navarro L (2010) 'Garbi' Mandarin: a new late-maturing triploid hybrid. *HortScience* 45:139-141
- Aleza P, Juarez J, Ollitrault P, Navarro L (2009) Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. *Plant Cell Reports* 28:1837-1846
- Aleza P, Juarez J, Hernandez M, Pina J, Ollitrault P, Navarro L (2009) Recovery and characterization of a *Citrus clementina* Hort. ex Tan. 'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole *Citrus* genome sequence. *BMC Plant Biology* 9:110
- Allen JO (2005) Effect of teosinte cytoplasmic genomes on maize phenotype. *Genetics* 169:863-880
- Alonzo G, Fatta del Bosco S, Palazzolo E, Saiano F, Tusa N (2000) Citrus cybrid leaf essential oil. *Flavour and Fragrance Journal* 15:91-95
- Arisumi T (1985) Rescuing abortive *Impatiens* hybrids through aseptic culture of ovules. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110:273-276
- Atienza SG, Martin AC, Ramirez MC, Martin A, Ballesteros J (2007) Effects of *Hordeum chilense* cytoplasm on agronomic traits in common wheat. *Plant Breeding* 126:5-8
- Babiychuk E, Schantz R, Cherep N, Weil JH, Gleba Y, Kushnir S (1995) Alterations in chlorophyll a/b binding proteins in *Solanaceae* cybrids. *Molecular and General Genetics* 249:648-654
- Barkley N, Roose M, Krueger R, Federici C (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 112:1519-1531
- Barrett H (1974) Colchicine-induced polyploidy in *Citrus*. *Botanical Gazette* 135:29-41
- Barrett HC, Hutchison DJ (1978) Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*. *Economic Botany* 32:27-45
- Barrett HC, Rhodes AM (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany* 1:105-136
- Barsby TL, Yarrow SA, Kemble RJ, Grant I (1987) The transfer of cytoplasmic male sterility to winter-type oilseed rape (*Brassica napus* L.) by protoplast fusion. *Plant Science, Irish Republic* 53:243-248

- Bassene J-B, Berti L, Carcouet E, Dhuique-Mayer C, Fanciullino A-L, Bouffin J, Ollitrault P, Froelicher Y (2008) Influence of Mitochondria Origin on Fruit Quality in a Citrus Cybrid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:8635-8640
- Bassene J-B, Berti L, Costantino G, Carcouet E, Kamiri M, Tomi F, Dambier D, Ollitrault P, Froelicher Y (2009a) Inheritance of Characters Involved in Fruit Quality in a Citrus Interspecific Allotetraploid Somatic Hybrid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:5065-5070
- Bassene J, Froelicher Y, Dhuique-Mayer C, Mouhaya W, Ferrer R, Ancillo G, Morillon R, Navarro L, Ollitrault P (2009b) Non-additive phenotypic and transcriptomic inheritance in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon*: the case of pulp carotenoid biosynthesis pathway. *Plant Cell Reports* 28:1689-1697
- Bassene JB (2009) Implications des interactions noyaux cytoplasmes et de l'allopolyploidisation sur l'expression phénotypique et génomique chez les agrumes. Université de Corse, Corté, p 200
- Bastiaanssen HJM, Van Den Berg P, Lindhout P, Jacobsen E, Ramanna MS (1998) Postmeiotic restitution in 2n-egg formation of diploid potato. *Heredity* 81:20-27
- Blakeslee AF, Belling J, Farham ME, Bergner AD (1922) A haploid mutant in the Jinson weed, *Datura Stramonium*. *Science* 55:646-647
- Bravo JE, Evans DA (1985) Protoplast fusion for crop improvement. In: Janick J (ed) *Plant breeding reviews*. AVI, pp 193-218
- Brieger FG, Gurgel JTA (1941) Influência do cavalo sobre a fertilidade do polen no cavaleiro, em citrus. *Bragântia* 1:713-757
- Butow RA, Avadhani NG (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular cell* 14:1-15
- Cabasson CM, Luro F, Ollitrault P, Grosser JW (2001) Non-random inheritance of mitochondrial genomes in Citrus hybrids produced by protoplast fusion. *Plant Cell Reports* 20:604-609
- Cai X, Fu J, Chen C, Guo W (2009) Cybrid/hybrid plants regenerated from somatic fusions between male sterile Satsuma mandarin and seedy tangelos. *Scientia Horticulturae* 122:323-327
- Cai X, Fu J, Deng X, Guo W (2007) Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile Satsuma mandarin and two seedy Citrus cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90:275-283
- Cameron J, Burnett R (1978) Use of sexual tetraploid seed parents for production of triploid citrus hybrids. *HortScience* 13:167-169
- Cameron J, Frost H (1968) Genetics, breeding and nucellar embryony. *The citrus industry Berkeley: University of California* 2:325-370
- 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. *Proceedings first international Citrus symposium* 1:199-205
- Carimi F, De Pasquale F, Crescimanno F (1995) Somatic embryogenesis in Citrus from styles culture. *Plant Science* 105:81-86
- Carlsson J, Leino M, Glimelius K (2007) Mitochondrial genotypes with variable parts of *Arabidopsis thaliana* DNA affect development in *Brassica napus* lines. *Theoretical and Applied Genetics* 115:627-641
- Carlsson J, Leino M, Sohlberg J, Sundstroem JF, Glimelius K (2008) Mitochondrial regulation of flower development. *Mitochondrion* 8:74-86

- Carol P, Kuntz M (2001) A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends in Plant Science* 6:31-36
- Chen CL, Guo WW, Yi HL, Deng XX (2004) Cytogenetic analysis of two interspecific Citrus allotetraploid somatic hybrids and their diploid fusion parents. *Plant Breeding* 123:332-337
- Chen CX, Lyon MT, O'Malley D, Federici CT, Gmitter J, Grosser JW, Chaparro JX, Roose ML, Gmitter FG, Jr. (2008) Origin and frequency of 2n gametes in Citrus sinensis * Poncirus trifoliata and their reciprocal crosses. *Plant Science* 174:1-8
- Chen ZG, Wang MQ, Liao HH (1980) Induction of plantlets from Citrus pollen. *Acta Genet Sin* 7:189-191
- Chen ZJ (2007) Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* 58:377-406
- Chen ZJ, Comai L, Pikaard CS (1998) Gene dosage and stochastic effects determine the severity and direction of uniparental ribosomal RNA gene silencing (nucleolar dominance) in Arabidopsis allopolyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:14891-14896
- Collonnier C, Fock I, Daunay MC, Servaes A, Vedel F, Siljak-Yakovlev S, Vongthip S, Darasinh S (2003) Somatic hybrids between Solanum melongena and S. sisymbriifolium, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant Science* 164:849-861
- Comai L (2000) Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology* 43:387-399
- Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid *Nature Reviews Genetics* 6:836-846
- Corazza-Nunes MJ, Machado MA, Nunes WMC, Cristofani M, Targon MLPN (2002) Assessment of genetic variability in grapefruits (Citrus paradisi Macf.) and pummelos (C. maxima (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica* 126:169-176
- Del Bosco SF, Tusa N, Conicella C (1999) Microsporogenesis in a Citrus interspecific tetraploid somatic hybrid and its fusion parents. *Heredity* 83:373-377
- Demarly Y, Sibi M (1996) Amélioration des plantes et biotechnologies, JOHN Libbey Eurotext-AUPELF-UREF edn. AUPELF-UREF
- Demesure B, Sodzi N, Petit RJ (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4:129-131
- Duminil J, Pemonge MH, Petit RJ (2002) A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes* 2:428-430
- Dumolin-Lapegue S, Pemonge MH, Petit RJ (1997) An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology* 6:393-397
- Dutilleul C, Garmier M, Noctor G, Mathieu C, Chetrit P, Foyer CH, Paepe Rd (2003) Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* 15:1212-1226
- Esen A, Soost R (1971) Unexpected triploids in Citrus: their origin, identification, and possible use. *Journal of Heredity* 62:329
- Esen A, Soost R (1972) Aneuploidy in Citrus. *American Journal of Botany* 59:473-477
- Esen A, Soost R (1973) Seed development in citrus with special reference to 2X x 4X crosses. *American Journal of Botany* 60:448-462
- Esen A, Soost R, Geraci G (1978) Seed set, size, and development after 4x x 2x and 4x x 4x crosses in citrus. *Euphytica* 27:283-294

- Esen A, Soost RK, Geraci G (1979) Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in Citrus. *Journal of Heredity* 70:5
- Fanciullino AL, Gancel AL, Froelicher Y, Luro F, Ollitrault P, Brillouet JM (2005) Effects of nucleo-cytoplasmic interactions on leaf volatile compounds from citrus somatic diploid hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4517-4523
- FAOSTAT. (2009) <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>
- Farbos I, Mouras A, Bereterbide A, Glimelius K (2001) Defective cell proliferation in the floral meristem of alloplasmic plants of *Nicotiana tabacum* leads to abnormal floral organ development and male sterility. *Plant Journal* 26:131-142
- Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML (1998) Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 96:812-822
- Feldman M, Liu B, Segal G, Abbo S, Levy AA, Vega JM (1997) Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* 147:1381-1387
- Ferrante S, Lucretti S, Reale S, De Patrizio A, Abbate L, Tusa N, Scarano M (2010) Assessment of the origin of new citrus tetraploid hybrids (2n= 4x) by means of SSR markers and PCR based dosage effects. *Euphytica* 173:223–233
- Flagel L, Udall J, Nettleton D, Wendel J (2008) Duplicate gene expression in allopolyploid *Gossypium* reveals two temporally distinct phases of expression evolution. *BMC Biology* 6:16
- Fock I, Collonnier C, Lavergne D, Vaniet S, Ambroise A, Luisetti J, Kodja H, Sihachakr D (2007) Evaluation of somatic hybrids of potato with *Solanum stenotomum* after a long-term in vitro conservation. *Plant Physiology and Biochemistry* 45:209-215
- Forner-Giner MA, Primo-Millo E, Forner JB (2009) Performance of Forner-Alcaide 5 and Forner-Alcaide 13, hybrids of Cleopatra mandarin x Poncirus trifoliata, as Salinity-Tolerant Citrus Rootstocks *Journal of the American Pomological Society* 63:63-66
- Froelicher Y (1999) Analyse de la diversité du genre *Clausena* et modalité de son exploitation en amélioration variétale. Orsay, Paris Sud, Doctorat de l'Université, p 158
- Froelicher Y, Bassene J-B, Jedidi-Neji E, Dambier D, Morillon R, Bernardini G, Costantino G, Ollitrault P (2007) Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Reports* 26:937-944
- Froelicher Y, Dambier D, Bassene JB, Costantino G, Lotfy S, Didout C, Beaumont V, Brottier P, Risterucci AM, Luro F, Ollitrault P (2008) Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Resources* 8:119-122
- Froelicher Y, Lotfy S, Rist D, Luro F, Carreel F, Ollitrault P (2000) Development of CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) for cytoplasmic genome studies in Aurantioideae sub-family. *International Citrus Congress, Orlando, Florida*, p 207
- Froelicher Y, Mouhaya W, Bassene JB, Costantino G, Kamiri M, Luro F, Morillon R, Ollitrault P (accepté) New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics & Genomes*
- Froelicher Y, Ollitrault P (1998) Effects of the hormonal balance on *Clausena excavata* androgenesis. *ISHS*, pp 139-146
- Frost H (1925) Tetraploidy in citrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 11:535
- Frost H, Soost R (1968) Seed reproduction: development of gametes and embryos. *The citrus industry* 2:290-324

- Gallesio G (1811) *Traité du citrus*. L. Fantin
- Gancel AL, Grimplet J, Sauvage FX, Ollitrault P, Brillouet JM (2006) Predominant expression of diploid mandarin leaf proteome in two citrus mandarin-derived somatic allotetraploid hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:6212-6218
- Gancel AL, Olle D, Ollitrault P, Luro F, Brillouet JM (2002) Leaf and peel volatile compounds of an interspecific citrus somatic hybrid [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.+*Citrus paradisi* Macfayden]. *Flavour and Fragrance Journal* 17:416-424
- Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM (2003) Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:6006-6013
- Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM (2005a) Citrus somatic allotetraploid hybrids exhibit a differential reduction of leaf sesquiterpenoid biosynthesis compared with their parents. *Flavour and Fragrance Journal* 20:626-632
- Gancel AL, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet JM (2005b) Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:2224-2230
- Geraci G, Esen A, Soost R (1975) Triploid progenies from 2x x 2x crosses of Citrus cultivars. *J Hered* 66:177-178
- Geraci G, Starrantino A, Recupero G, Ruso F (1982) Spontaneous triploidy in progenies of monoembryonic hybrids of Clementine 'Commune x King of Siam'. *Genet Agri* 36:113-118
- Germana M, Chiancone B (2001) Gynogenetic haploids of Citrus after in vitro pollination with triploid pollen grains. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66:59-66
- Germana M, Chiancone B (2003) Improvement of Citrus clementina Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration. *Plant Cell Reports* 22:181-187
- Germana M, Crescimanno F, De Pasquale F, Yu Ying W (1992) Androgenesis in 5 cultivars of Citrus limon L. Burm. f. In *Vitro Culture*, XXIII IHC 300. *Acta Hort.*, pp 315-324
- Germana MA (1997) Haploidy in *Citrus*. In: Jain S. M. SSK, Veilleux R. E. (ed) *In Vitro Haploid Production in Higher Plants Vol 5:Oil, Ornamental and Miscellaneous Plants*. Kluwer Academic Publishers, pp 195-217
- Germana MA, Reforgiato Recupero G (1997) Haploid embryos regeneration from anther culture of 'Mapo' tangelo (*Citrus deliciosa* x *C. paradisi*). *Advances in Horticultural Science* 11:147-152
- Germana MA, Wang YY, Barbagallo MG, Iannolino G, Crescimanno FG (1994) Recovery of haploid and diploid plantlets from anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. and *Citrus reticulata* Blanco. *Jornal of Horticultural Science* 69:473-480
- Glimelius K, Fahlesson J, Landgren M, Sjödin C, Sundberg E (1991) Gene transfer via somatic hybridization in plants. *Trends in biotechnology* 9:24-30
- Gmitter FG, Jr., Hu X (1990) The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae). *Economic Botany* 44:267-277
- Gmitter Jr F, Ling X (1991) Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicine. *Journal of the American Society for Horticultural Science (USA)*

- Gmitter Jr F, Ling X, Cai C, Grosser J (1991) Colchicine-induced polyploidy in *Citrus* embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Science* 74:135-141
- Gómez A, He Y, Pereira A (2006) Non-destructive measurement of acidity, soluble solids and firmness of Satsuma mandarin using Vis/NIR-spectroscopy techniques. *Journal of food engineering* 77:313-319
- Green RM, Vardi A, Galun E (1986) The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species and comparison with related genera. *Theoretical and Applied Genetics* 72:170-177
- Grosser JW, Chandler JL (2004) Production of twelve new allotetraploid somatic hybrid citrus breeding parents with emphasis on late maturity and cold-hardiness. *Journal of American Pomological Society* 58:21-28
- Grosser JW, Chandler JL, Duncan LW (2007) Production of mandarin+pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Horticulturae* 113:33-36
- Grosser JW, Gmitter FG (1990) Protoplast fusion and *Citrus* improvement. *Plant Breeding reviews*, pp 339-374
- Grosser JW, Gmitter FG, Castle WS, Chandler JL (1996a) Production and evaluation of *Citrus* somatic hybrid rootstocks : progress report. *Proc Int Soc Citriculture*, pp 1246-1250
- Grosser JW, Gmitter FG, Chandler JL (1988b) Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species : *Citrus sinensis* and *Severinia disticha*. *Theor Appl Genet* 75:397-401
- Grosser JW, Gmitter FG, Louzada ES, Chandler JL (1992a) Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless *Citrus* development. *HortScience* 27:1125-1127
- Grosser JW, Gmitter FG, Tusa N, Reforgiatio Recupero G, Cucinotta P (1996b) Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. *Plant Cell Rep* 15:672-676
- Grosser JW, Ollitrault P, Olivares-Fuster O (2000) Somatic hybridization in citrus: an effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36:434-449
- Guerra M (1984) Cytogenetics of Rutaceae. 2. Nuclear DNA content. *Caryologia* 37:219-226
- Gulsen O, Roose ML (2001) Lemons: diversity and relationships with selected *Citrus* genotypes as measured with nuclear genome markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126:309-317
- Guo WW, Deng XX (1999) Intertribal hexaploid somatic hybrid plants regeneration from electrofusion between diploids of *Citrus sinensis* and its sexually incompatible relative, *Clausena lansium*. *Theoretical and Applied Genetics* 98:581-585
- Guo WW, Deng XX, Yi HL (2000) Somatic hybrids between navel orange (*Citrus sinensis*) and grapefruit (*C. paradisi*) for seedless triploid breeding. *Euphytica* 116:281-285
- Guo WW, Prasad D, Cheng YJ, Serrano P, Deng XX, Grosser JW (2004a) Targeted cybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Reports* 22:752-758
- Guo WW, Prasad D, Serrano P, Gmitter FG, Jr., Grosser JW (2004b) Citrus somatic hybridization with potential for direct tetraploid scion cultivar development. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79:400-405
- Hanson MR (1991) Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annual Review of Genetics* 25:461-486

- Hanson MR, Bentolila S (2004) Interactions of Mitochondrial and Nuclear Genes That Affect Male Gametophyte Development. *Plant Cell* 16:S154-169
- He P, Friebe BR, Gill BS, Zhou JM (2003) Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Molecular Biology* 52:401-414
- Hearn C (1984) Development of seedless orange and grapefruit cultivars through seed irradiation. *J Amer Soc Hort Sci* 109:270-273
- Hegarty MJ, Barker GL, Wilson ID, Abbott RJ, Edwards KJ, Hiscock SJ (2006) Transcriptome shock after interspecific hybridization in *Senecio* is ameliorated by genome duplication. *Current Biology* 16:1652-1659
- Hegarty MJ, Hiscock SJ (2008) Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current Biology* 18:R435-R444
- Herrero R, Asins MJ, Pina JA, Carbonell EA, Navarro L (1996) Genetic diversity in the orange subfamily *Aurantioideae*. II. Genetic relationships among genera and species. *Theoretical and Applied Genetics* 93:1327-1334
- Hidaka T (1984) Induction of plantlets from anthers of 'Trovia' orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *J Japanese Soc Hort Sci* 53:1-5
- Hidaka T, Takayanagi R, Shinozaki S, Fujita K, Omura M (1992) Somatic hybrids obtained by electro-fusion among *Citrus* and its wild relatives. *Plant Tissue Culture and Gene Manipulation for Breeding and Formation of Phytochemicals*:225-235
- Hidaka T, Yamada Y, Shichijo T (1979) *In vitro* differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Jpn J Breed* 29:248-254
- Hodgson RW (1967) Horticultural varieties of *Citrus*. In: Reuther W, Webber HJ, D. BL (eds) *The Citrus Industry*. University of California, Riverside, pp 431-589
- Hutchinson D, Barrett H (1981) Tetraploid frequency in nucellar seedlings from single trees of Carrizo and Troyer *Citrus* hybrids. pp 27-29
- Iglesias DJ, Tadeo FR, Legaz F, Primo-Millo E, Talon M (2001) *In vivo* sucrose stimulation of colour change in citrus fruit epicarps: Interactions between nutritional and hormonal signals. *Physiologia Plantarum* 112:244-250
- Iglesias L, Lima H, Simon J (1974) Isoenzyme identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. *Journal of Heredity* 65:81
- Iwamasa M (1966) Studies on the sterility in genus *Citrus* with special reference to the seedlessness. *Bulletin of the Horticultural Research Station, Japan, Series B* 6:1-81
- Iwamasa M, Iwasaki T (1963) On the sterility phenomenon caused by low temperatures in the Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swing.). *Bul Hort Res Sta Japan* 2:25-45
- Iwamasa M, Nito N, Ling JT (1988) Intra- and intergeneric hybridization in the Orange subfamily, *Aurantioideae*. In: Goren R, Mendel K (eds) *Proc 6th Int Citrus Congr*. Tel Aviv, Israel, vol 1, . In: Goren R, K M (eds) *Proc 6th Int Citrus Congr*, Tel Aviv, Israel, pp 123-130
- Iwamasa M, Ueno I, Nishiura M (1967) Inheritance of nucellar embryony in citrus. *Bulletin of the Horticultural Research, Shizuoka* 7:1-8
- Jena S, Kumar K, Nair N (2009) Molecular phylogeny in Indian *Citrus* L. (Rutaceae) inferred through PCR-RFLP and trnL-trnF sequence data of chloroplast DNA. *Scientia Horticulturae* 119:403-4169
- Kao KN, Michayluk MR (1974) A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115:355-367
- Kawano S (1994) Present condition of nondestructive quality evaluation of fruits and vegetables in Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly* 28:212-212

- Kellogg EA (2003) What happens to genes in duplicated genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:4369-4371
- Khan IA, Kender WJ (2007) Citrus breeding: introduction and objectives. In: Khan IA (ed) *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. Cabi Publishing pp 1-8
- Khush GS, Virmani SS (1996) Haploids in plant breeding. In: Jain S.M. SSK, Veilleux R.E. (ed) *In Vitro Haploid Production in Higher Plants Vol 1: Fundamental Aspects and Methods*. Kluwer Academic Publishers, pp 11-33
- Krug C (1943) Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus *Citrus*. *Botanical Gazette* 104:602-611
- Krug C, Bacchi O (1943) Triploid varieties of *Citrus*. *J Hered* 34:277-283
- Lai Z, Gross BL, Zou Y, Andrews J, Rieseberg LH (2006) Microarray analysis reveals differential gene expression in hybrid sunflower species. *Molecular Ecology* 15:1213-1227
- Landry CR, Hartl DL, Ranz JM (2007) Genome clashes in hybrids: insights from gene expression. *Heredity* 99:483-493
- Lapin WK (1937) Investigation on polyploidy in citrus work. *All-Unian Sci Res Inst Humid sabtrop* 1:1-68
- Lee C, Power J (1988) Intraspecific gametosomatic hybridisation in *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports* 7:17-18
- Lee HS, Chen ZJ (2001) Protein-coding genes are epigenetically regulated in *Arabidopsis* polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:6753-6758
- Lee LS, Gillespie D, Shaw R (1990) Prospects for using citrus tetraploids for rootstocks. *Proc 3rd World Congr Int Soc of Citrus Nurserymen Australia*
- Lefrançois C, Chupeau Y, Bourgin J (1993) Sexual and somatic hybridization in the genus *Lycopersicon*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 86:533-546
- Leino M, Teixeira R, Landgren M, Glimelius K (2003) *Brassica napus* lines with rearranged *Arabidopsis* mitochondria display CMS and a range of developmental aberrations. *Theoretical and Applied Genetics* 106:1156-1163
- Leitch IJ, Bennett MD (1997) Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* 2:470-476
- Linke B, Nothnagel T, Borner T (2003) Flower development in carrot CMS plants: mitochondria affect the expression of MADS box genes homologous to GLOBOSA and DEFICIENS. *Plant Journal* 34:27-37
- Liu JH, Pang XM, Cheng YJ, Meng HJ, Deng X (2002) Molecular characterization of the nuclear and cytoplasmic genomes of intergeneric diploid plants from cell fusion between *Microcitrus papuana* and Rough lemon. *Plant Cell Reports* 21:327-332
- Liu Z, Butow RA (2006) Mitochondrial retrograde signaling. *Annual Review of Genetics* 40:159-185
- Longley AE (1925) Polycary, polyspory and polyploidy in *Citrus* and *Citrus* relatives. *J Wash Acad Sci* 15:347-351
- Lotfy S, Luro F, Carreel F, Froelicher Y, Rist D, Ollitrault P (2003) Application of cleaved amplified polymorphic sequence method for analysis of cytoplasmic genome among Aurantioideae intergeneric somatic hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128:225-230
- Luro F, Maddy F, Jacquemond C, Froelicher Y, Morillon R, Rist D, Ollitrault P (2004) Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. *Acta Horticulturae*:841-847

- Luro F, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (2008) Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics* 9:287
- Lynch M, Force AG (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization *Genetics* 154:459-473
- Mabberley D (1998) Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae). *Telopea* 7:333-344
- Mabberley D (2004) Citrus (Rutaceae): a review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 49 2:481-498
- Madlung A, Masuelli RW, Watson B, Reynolds SH, Davison J, Comai L (2002) Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic Arabidopsis allotetraploids. *Plant Physiology* 129:733-746
- Madlung A, Tyagi A, Watson B, Jiang H, Kagochi T, Doerge R, Martienssen R, Comai L (2005) Genomic changes in synthetic Arabidopsis polyploids. *Plant Journal* 41:221-230
- Malik M, Vyas P, Rangaswamy NS, Shivanna KR (1999) Development of two new cytoplasmic male-sterile lines in *Brassica juncea* through wide hybridization. *Plant Breeding* 118:75-78
- Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Remesy C (2003) Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *European journal of clinical nutrition* 57:235-242
- Marmagne A, Brabant P, Thiellement H, Alix K Analysis of gene expression in resynthesized *Brassica napus* allotetraploids: transcriptional changes do not explain differential protein regulation. *New Phytologist* 186:216-227
- Masson J, Pelletier G (1987) Contribution de l'hybridation somatique à l'amélioration de la pomme de terre. *C R Acad Agric Fr* 73:11-18
- Masterson J (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264:421
- Menke U, Schilde-Rentschler L, Ruoss B, Zanke C, Hemleben V, Ninnemann H (1996) Somatic hybrids between the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. and the 1EBN wild species *Solanum pinnatisectum* Dun.: morphological and molecular characterization. *Theoretical and Applied Genetics* 92:617-626
- Metzlaff M, Pohlheim F, Börner T, Hagemann R (1982) Hybrid variegation in the genus *Pelargonium*. *Current Genetics* 5:245-249
- Moreira CD, Chase CD, Gmitter FG, Jr., Grosser JW (2000a) Inheritance of organelle genomes in citrus somatic cybrids. *Molecular Breeding* 6:401-405
- Moreira CD, Chase CD, Gmitter FG, Jr., Grosser JW (2000b) Transmission of organelle genomes in citrus somatic hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61:165-168
- Moreira CD, Gmitter FG, Jr., Grosser JW, Huang S, Ortega VM, Chase CD (2002) Inheritance of Organelle DNA Sequences in a Citrus-Poncirus Intergeneric Cross. *J Hered* 93:174-178
- Motomura T, Hidaka T, Akihama T, Katagi S, Berhow MA, Moriguchi T, Omura M (1997) Protoplast fusion for production of hybrid plants between *Citrus* and its related genera. *J Japan Soc Hort Sci* 65:682-692
- Mouhaya W, Allario T, Brumos J, Andres F, Froelicher Y, Luro F, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (Soumis) Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability. *Functional Plant Biology*

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497
- Murashige T, Tucker DPH (1969) Growth factor requirement of *Citrus* tissue culture. *Proc 1st Int Citrus Symp*, pp 1155-1161
- Nagai K, Tanikawa T (1928) On citrus pollination. *Third Pan-Pacific Sci Cong(Tokyo, 1928)* Proc 2 2023:2039
- Navarro L, Juarez J, Aleza P, Pina JA (2002) Recovery of triploid seedless mandarin hybrids from 2n x 2n and 2n x 4n crosses by embryo rescue and flow cytometry. *Proceedings of the 10th IAPTC&B Congress, plant biotechnology 2002 and beyond, Orlando*, pp 541-544
- Navarro L, Roistacher C, Murashige T (1975) Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. *J Amer Soc Hort Sci* 100:471-479
- Newton KJ, Gabay-Laughnan S, De Paepe R (2004) Mitochondrial mutations in plants. In: Day DA, Millar, A.H., Whelan, J. (ed) *Plant Mitochondria: From Genome to Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston, London, pp 121-141
- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet* 100:1155 - 1166
- Nicolosi E, Malfa Sl, El-Otmani M, Negbi M, Goldschmidt EE (2005) The search for the authentic citron (*Citrus medica* L.): historic and genetic analysis. *HortScience* 40:1963-1968
- Noctor G, Dutilleul C, Paepe Rd, Foyer CH (2004) Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany* 55:49-57
- Oberwalder B, Schilde-Rentschler L, Ruoß B, Wittemann S, Ninnemann H (1998) Asymmetric protoplast fusions between wild species and breeding lines of potato—effect of recipients and genome stability. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 97:1347-1354
- Ohgawara T, Kobayashi S, Ishii S, Yoshinaga K, Oiyama I (1991) Fertile fruit trees obtained by somatic hybridization : navel orange (*Citrus 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 hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifolata*. *Theor Appl Genet* 71:1-4
- Oiyama I, Okudai N, Takahara T (1981) Ploidy levels of seedlings obtained from 2x X 4x crosses in Citrus. *Proc Int Soc Citriculture*, pp 32-34
- Oiyama II, Kobayashi S (1993) Haploid obtained from diploid X triploid crosses of *Citrus*. *J Jpn Soc Hort Sci* 62:89-93
- Olivares-Fuster O, Duran-Vila N, Navarro L (2005) Electrochemical protoplast fusion in citrus. *Plant Cell Reports* 24:112-119
- Ollitrault P, Allent V, Luro F (1996a) Production of haploid plants and embryogenic calli of clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after *in situ* parthenogenesis induced by irradiated pollen. *Pro Int Soc Citriculture*, pp 913-917
- Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Carreel F, d'Hont A, Luro F, Bruyere S, Cabasson C, Lotfy S, Joumaa A, Vanel F, Maddi F, Treanton K, Grisoni M (2000a) Somatic hybridisation potential for Citrus germplasm utilization. *Cahiers Agricultures* 9:223-236
- Ollitrault P, Dambier D, Froelicher Y, Carreel F, D'Hont A, Luro F, Cabasson C, Lotfy S, Joumaa A, Fanny Vanel F, Treanton K, Grisoni M (2000b) Apport de l'hybridation

- somatique pour l'exploitation des ressources génétiques des agrumes. Cahier de l'agriculture 9:223-236
- Ollitrault P, Dambier D, Jaquemond C, Allent V, Luro F (1996b) In vitro rescue and selection of spontaneous triploids by flow cytometry for easy peeler citrus breeding. pp 254-258
- Ollitrault P, Dambier D, Luro F, Duperray C (1994) Nuclear genome size variations in *Citrus*. Fruits 49:390-393
- Ollitrault P, Dambier D, Sudahono, Luro F (1996c) Somatic hybridization in *Citrus* : Some new hybrid and alloplasmic plants. Pro Int Soc Citriculture, pp 907-912
- Ollitrault P, de Rocca Serra D (1992b) L'amélioration des agrumes : II- Créations variétales et biotechnologies. Fruits 47:124-134
- Ollitrault P, Froelicher Y, Dambier D, Luro F, Yamamoto M (2007a) Seedlessness and ploidy manipulations. In: Khan IA (ed) Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology. Cabi Publishing pp 197-218
- Ollitrault P, Guo WW, Grosser JW (2007b) Somatic hybridization. In: Khan IA (ed) Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology Cabi Publishing pp 235-260
- Ollitrault P, Jaquemond C, Dubois C, Luro F (1999) Les agrumes. In: Hamon PS, M.; Perrier, X.; Glaszmann, J.C. (ed) Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. Cirad, pp 89-111
- Ollitrault P, Luro F (1995) Amélioration des agrumes et biotechnologie. Fruits 50:267-279
- Ollitrault P, Michaux-Ferriere (1992) Etude critique de la technique de cytométrie en flux appliquée à l'amélioration des : Résultats obtenus pour quelques agrumes. Fruits 47:195-203
- Ollitrault P, Vanel F, Froelicher Y, Dambier D (1998b) Creation of triploid Citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. First International Citrus Biotechnology Symposium. Acta Horticulturae, pp 191-196
- Ollitrault P, Vanel F, Froelicher Y, Dambier D (2000c) Creation of triploid citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. Acta Horticulturae:191-197
- Orbovi V, aлови M, Vilorija Z, Nielsen B, Gmitter F, Castle W, Grosser J (2008) Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. Euphytica 161:329-335
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. Trends in Genetics 19:141-147
- Pandey KK, Grant JE, Williams EG (1987) Interspecific hybridisation between *Trifolium repens* and *T. uniflorum*. Australian Journal of Botany 35:171-182
- Pavan A, Calixto MC, Coutinho Caroso S, Januzzi Mendes MB, Bergamin A, Spotti Lopes RJ, De Carvalho RC, De Assis Alves Mourao R (2007) Evaluation of 'Hamlin' sweet orange + 'Montenegrina' mandarin somatic hybrid for tolerance to *Xanthomonas axonopodis* pv. citri and *Xylella fastidiosa*. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS
- Pelletier G, Budar F (2007) The molecular biology of cytoplasmically inherited male sterility and prospects for its engineering. Current Opinion in Biotechnology 18:121-125
- Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chetrt P, Remy R, Rousselle P, Renard M (1983) Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. Molecular And General Genetics 191:244-250
- Pereau-Leroy P (1951) Etude du pollen des agrumes. Annales de l'Institut des Fruits et Agrumes Coloniaux 2:1-18

- Pirrie A, Power J (1986) The production of fertile, triploid somatic hybrid plants (*Nicotiana glutinosa* (n)+ *N. tabacum* (2n)) via gametic: somatic protoplast fusion. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 72:48-52
- Posada H, Ferrand M, Davrieux F, Lashermes P, Bertrand B (2008) Stability across environments of the coffee variety near infrared spectral signature. *Heredity* 102:113-119
- Puite K, Roest S, Pijnacker L (1986) Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Cell Reports* 5:262-265
- Ramanna M, Hermsen J (1974) Embryoid formation in the anthers of some interspecific hybrids in *Solanum*. *Euphytica* 23:423-427
- Ramsey J, Schemske D (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:467-501
- Ramsey J, Schemske D (2002) NEOPOLYPLOIDY IN FLOWERING PLANTS. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:589-639
- Rangan T, Murashige T, Bitters W (1969) In vitro studies of zygotic and nucellar embryogenesis in Citrus. *Proc 1st Int Citrus Symposium, Riverside, California*, pp 225-229
- Rapisarda P, Fabroni S, Peterek S, Russo G, Mock HP (2009) Juice of New citrus hybrids (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.x *C. sinensis* L. Osbeck) as a source of natural antioxidants. *Food chemistry* 117:212-218
- Rapp RA, Wendel JF (2005) Research review; Epigenetic and plant evolution. *New Phytologist* 168:81-91
- Rhoads DM, Subbaiah CC (2007) Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* 7:177-194
- Roose ML, Williams TE (2007) Mutation Breeding. In: Khan IA (ed) *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. CAB International, Wallingford, pp 345-352
- Russo F, Torrisi M (1951) Il poliploidismo nei *Citrus* Autopoliploidi ed allopoliploidi. *Ann Sper Agr* 5:1041-1062
- Russo G, Recupero S, Puglisi A, Recupero GR (2004) New triploid citrus hybrids by Italian genetic improvement. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 66:14-18
- Saleh B, Allario T, Dambier D, Ollitrault P, Morillon R (2008) Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid. *Comptes Rendus Biologies* 331:703-710
- Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF (2005) Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* 14:1163-1175
- Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130:2073S
- Schoenmakers H, Wolters A, Nobel E, De Klein C, Koornneef M (1993) Allotriploid somatic hybrids of diploid tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and monoploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* 87:328-336
- Scora RW (1975) On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 102:369-375
- Sidorov V, Menczel L, Nagy F, Maliga P (1981) Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. *Planta* 152:341-345
- Sihachakr D, Haicour R, Serraf I, Barrientos E, Herbreteau C, Ducreux G, Rossignol L, Souvannavong V (1988) Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* C.B. CLARK. *Plant Science* 57:215-223
- Sinclair WB (1984) *The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits*, The Regents of the University of California edn, Oakland, California

- Soltis D, Soltis P (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12:243-243
- Soltis D, Soltis P, PIRES J, Kovarik A, Tate J, Mavrodiev E (2004) Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (Asteraceae): cytogenetic, genomic and genetic comparisons. *Genetics*
- Soost R (1965) Incompatibility alleles in the genus *Citrus*. pp 176-180
- Soost R (1987) Breeding citrus-genetics and nucellar embryony. In "Improving vegetatively propagated crops", ed. by AJ Abbott and RK Atkin. Academic Press, London (England)
- Soost R, Cameron J (1975) *Citrus*. *Advances in fruit breeding*:229-241
- Soost RK (1969) The incompatibility gene system in *Citrus*. In: Homero C (ed) Proc 1st int *Citrus Symp*, Riverside, California, pp 89-190
- Starrantino A (1992) Use of triploids for production of seedless cultivars in *Citrus* improvement programs. VIIth Int *Citrus Cong Proc*. Int. Soc. Citric., pp 117-121
- Starrantino A (1999) Tacle, a new triploid clementine * Tarocco hybrid. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 61:45-47
- Starrantino A, Recupero GR (1981) *Citrus* hybrids obtained invitro from 2x female X 4x males. . *Proc Int Soc Citriculture*, pp 31-32
- Stift M, Berenos C, Kuperus P, van Tienderen P (2008) Segregation models for disomic, tetrasomic and intermediate inheritance in tetraploids: a general procedure applied to *Rorippa* (Yellow Cress) microsatellite data. *Genetics* 179:2113
- Stubbe W, Steiner E (1999) Inactivation of pollen and other effects of genome-plastome incompatibility in *Oenothera*. *Plant Systematics and Evolution* 217:259-277
- Sun Y, Xue Q, Zhang X, Ding C, Zhang L, Gong M, Bu G, Wang W (2007) Morphological, cytological and molecular characterization of a novel symmetric somatic hybrid between *N. tabacum* and *N. glauca*. *Plant Biosystems* 141:129-133
- Swanson-Wagner RA, Jia Y, Decook R, Borsuk LA, Nettleton D, Schnable PS (2006) All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F1 hybrid and its inbred parents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6805-6810
- Swingle WT, Reece PC (1967) The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, D. BL (eds) *The Citrus Industry*. University of California, USA, Riverside, pp 190-430
- Taiz L, Zeiger E (1998) *Plant physiology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, p 792
- Tanaka T (1977) Fundamental discussion of *Citrus* classification. *Stud Citrologia* 14:1-6
- Tate JA, Ni ZF, Scheen AC, Koh J, Gilbert CA, Lefkowitz D, Chen ZJ, Soltis PS, Soltis DE (2006) Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae), a recent and reciprocally formed allopolyploid. *Genetics* 173:1599-1611
- Teixeira RT, Knorpp C, Glimelius K (2005) Modified sucrose, starch, and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B. napus*. *Journal of Experimental Botany* 56:1245-1253
- Télef N, Stammitti-Bert L, Mortain-Bertrand A, Maucourt M, Carde J, Rolin D, Gallusci P (2006) Sucrose deficiency delays lycopene accumulation in tomato fruit pericarp discs. *Plant Molecular Biology* 62:453-469
- Téoulé Y (1992) Fusions de protoplastes et variabilité génétique. In: BRG (ed) *Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes*, Paris, France, pp 269-277
- Thomzik JE, Hain R (1988) Transfer and segregation of triazine tolerant chloroplasts in *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 76:165-171

- Tolkowski S (1938) *Hesperides: a history of the culture and use of citrus fruits*. John Bale Sons & Curnow, Londres, UK
- Toolapong P, Komatsu H, Iwamasa M (1996) Triploids and haploid progenies derived from small seeds of 'Banpeiyu' pummelo, crossed with 'Ruby Red' grapefruit. *J Japan Soc Hort Sci* 65:255-260
- Torres AM, Soost RK, Diedenhofen U (1978) Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. *American Journal of Botany* 65:869-881
- Torres A, Soost R, Mau-Lastovicka T (1982) Citrus isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. *Journal of Heredity* 73:335
- Trabut L (1902) L'hybridation des Citrus: Une nouvelle tangerine "La Clementine". *Revue Horticole* 74:232-234
- Tucker GA (1993) Introduction. In: Seymour G, Taylor, J., Tucker, G., (ed) *Biochemistry of fruit ripening*. Chapman and Hall, London, United Kingdom, pp 1-37
- Tusa N, Abbate L, Renda A, Ruberto G (2007) Polyphenols Distribution in Juices from Citrus Allotetraploid Somatic Hybrids and Their Sexual Hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:9089-9094
- Tusa N, Bosco SFd (1997) A new source of Citrus genetic variability: the fertile allotetraploid somatic hybrid breeding parent 'Valencia sweet orange + Femminello lemon'. *Advances in Horticultural Science* 11:55-58
- Tusa N, Bosco SFd, Nigro F, Ippolito A (2000) Response of cybrids and a somatic hybrid of lemon to *Phoma tracheiphila* infections. *HortScience* 35:125-127
- Ueno I (1978) Studies of cross-incompatibility in Citrus tachibana Tanaka, 1: Fruit set of Tachibana after cross pollination with eight citrus varieties. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station Series B Okitsu (Japan)*
- Vardi A, Breiman A, Galun E (1987) Citrus cybrids: production by donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles. *Theoretical and Applied Genetics* 75:51-58
- Vardi A, Neumann H, Frydman-Shani A, Yaniv Y, Spiegel-Roy P (1998) Tentative model on the inheritance of juvenility, self-incompatibility and parthenocarpy. *ISHS*, pp 199-206
- Waara S, Glimelius K (1995) The potential of somatic hybridization in crop breeding. *Euphytica* 85:217-233
- Wakana A, Park S, Hanada N, Fukudome I, Kajiwara K (2005) Production of Tetraploid Forms of Acid Citrus Cultivars by Top Grafting of Shoots with Sprouting Axially Buds Treated with Colchicine. *J Fac Agr Kyushu Univ* 50:93-102
- Walsh KB, Golic M, Greensill CV (2004) Sorting of fruit using near infrared spectroscopy: application to a range of fruit and vegetables for soluble solids and dry matter content. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 12:141-148
- Wang JL, Tian L, Lee HS, Wei NE, Jiang HM, Watson B, Madlung A, Osborn TC, Doerge RW, Comai L, Chen ZJ (2006) Genomewide nonadditive gene regulation in Arabidopsis allotetraploids. *Genetics* 172:507-517
- Webber HJ (1948) History, botany, and breeding. In: Webber H, Batchelor L (eds) *The Citrus Industry*. University of California press, pp 475-913
- Wendel J (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42:225-249
- Wolfe K (2001) Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature reviews Genetics* 2:333-341
- Woodson JD, Chory J (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature reviews Genetics* 9:383-395

- Wu J, Ferguson AR, Mooney PA (2005) Allotetraploid hybrids produced by protoplast fusion for seedless triploid Citrus breeding. *Euphytica* 141:229-235
- Wu R, Gallo-Meagher M, Littell RC, Zeng Z-B (2001) A General Polyploid Model for Analyzing Gene Segregation in Outcrossing Tetraploid Species. *Genetics* 159:869-882
- Xu X, Liu J, Deng X (2006) Isolation of cytoplasts from Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) and production of alloplasmic hybrid calluses via cytoplast–protoplast fusion. *Plant Cell Reports* 25:533-539
- Yamamoto M, Kobayashi S (1995) A cybrid plant produced by electrofusion between *Citrus unshiu* (satsuma mandarin) and *C. sinensis* (sweet orange). *Plant Tissue Culture Letter* 12:131-137
- Yamamoto M, Kobayashi S, Nakamura Y, Yamada Y (1993) Phylogenic relationships of citrus revealed by RFLP analysis of mitochondrial and chloroplast DNA. *Japanese Journal of Breeding* 43:355-365
- Yamamoto M, Matsumoto R, Okudai N, Yamada Y (1997) Aborted anthers of Citrus result from gene-cytoplasmic male sterility. *Scientia Horticulturae* 70:9-14
- Yang SS, Cheung F, Lee JJ, Ha MS, Wei NE, Sze SH, Stelly DM, Thaxton P, Triplett B, Town CD, Chen ZJ (2006) Accumulation of genome-specific transcripts, transcription factors and phytohormonal regulators during early stages of fiber cell development in allotetraploid cotton. *Plant Journal* 47:761-775
- Yao JL, Cohen D (2000) Multiple gene control of plastome-genome incompatibility and plastid DNA inheritance in interspecific hybrids of *Zantedeschia*. *Theoretical and Applied Genetics* 101:400-406
- Yao JL, Cohen D, Rowland RE (1994) Inheritance and Plastome Genome Incompatibility in Interspecific Hybrids of *Zantedeschia* (Araceae). *Theoretical and Applied Genetics* 88:255-260
- Zhang D, Mabberley D (2008) Citrus. *Flora of China*, pp 90-96
- Zhang J, Zhang M, Deng X (2007) Obtaining autotetraploids in vitro at a high frequency in *Citrus sinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 89:211-216
- Zhang JF, Turley RB, Stewart JM (2008) Comparative analysis of gene expression between CMS-D8 restored plants and normal non-restoring fertile plants in cotton by differential display. *Plant Cell Reports* 27:553-561
- Zhou A, Xia G, Chen H, Hu H (2001) Comparative study of symmetric and asymmetric somatic hybridization between common wheat and *Haynaldia villosa*. *Science in China Series C - Life Sciences* 44:294-304
- Zimmermann U, Scheurch P (1981) High frequency fusion of plant protoplasts by electric field. *Planta* 151:26-32
- Zubko MK, Zubko EI, Gleba YY (2002) Self-fertile cybrids *Nicotiana tabacum* (+*Hyoscyamus aureus*) with a nucleo-plastome incompatibility. *Theoretical and Applied Genetics* 105:822-828
- Zubko MK, Zubko EI, Ruban AV, Adler K, Mock HP, Misera S, Gleba YY, Grimm B (2001) Extensive developmental and metabolic alterations in cybrids *Nicotiana tabacum* (+*Hyoscyamus niger*) are caused by complex nucleo-cytoplasmic incompatibility. *Plant Journal* 25:627-639

CURRICULUM VITAE

Nom : FROELICHER
Prénom : Yann
Date et lieu de naissance : 03 juillet 1969 à Ris Orangis (91)
Situation familiale : Marié, 4 enfants
Adresse professionnelle : Cirad, Centre Inra
20230 San Giuliano
Téléphone professionnel : 00 33 04 95 59 59 11
Téléphone personnel : 00 33 04 95 38 76 15
Email : froelicher@cirad.fr ou froelicher@corse.inra.fr

Docteur en Sciences

(Biotechnologie végétale et génétique)

Formation

1996-1999 Doctorat à l'Université de Paris XI Orsay, Convention Cifre associant le Groupe Pernod-Ricard et le Cirad-Flhor
1995 DEA de Biologie Forestière à l'Université de Nancy
1993 Maîtrise de Biologie moléculaire et génétique à l'Université de Paris XI Orsay
1992 Licence de Biochimie à l'Université de Paris XI Orsay
1991 Deug B à l'Université de Paris XI Orsay

Expériences professionnelles et Stages

Depuis 2000 Chargé de Recherches au CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) basé à la Station de Recherche Agronomique INRA de San Giuliano en Corse. Généticien en charge du programme d'innovation variétale chez les agrumes.

1999-2000 CDD Pernod SA et mis à disposition du Cirad-Flhor en Guadeloupe.

Mise en place d'une collection raisonnée de *Clausena* sp. à Trinidad en fonction de la diversité génétique et aromatique et de l'origine géographique des plantes.

1996-1999 Doctorat de Biologie cellulaire et Génétique « Organisation de la diversité dans le genre *Clausena* Burm.f. (*RUTACEAE*) et modalité de son exploitation en création variétale ». Université de Paris XI Orsay. Directeur de thèse, Prof G. Ducreux ; encadrement, Dr P. Ollitrault. Soutenue le 14 décembre 1999. Thèse classée « Confidentielle ».

1995 Stage de DEA à l'Inra d'Orléans « Effet de l'AIB sur la répartition du saccharose C¹⁴ et de ses métabolites au sein des microboutures de noyer hybride au cours de la phase de rhizogenèse ». Responsable de stage : C. Jay-Allemand.

Enseignements

2001 Enseignement à l'Université de Corse en 3^{ème} année d'IUP (12 heures) « Intérêts des biotechnologies en amélioration des plantes ».

2002 Enseignement à l'Université de Corse en DESS PAV (12 heures) « Intérêts des biotechnologies en amélioration des agrumes » et en 3^{ème} année d'IUP (16 heures) « Intérêts des biotechnologies en amélioration des plantes ».

2003 Enseignement à l'Université de Corse en DESS PAV (12 heures) « Intérêts des biotechnologies en amélioration des agrumes » et en 3^{ème} année d'IUP (16 heures) « Intérêts des biotechnologies en amélioration des plantes ».

2004-2007 Enseignement à l'Université de Corse en Master Recherche spécialité Biomolécules 2^{ème} année (9 heures) « Risques et acceptabilités des biotechnologies » et en Master professionnel spécialité Qualité et Valorisation des Productions du Bassin Méditerranéen 2^{ème} année (16 heures) « Intérêts des biotechnologies en amélioration des agrumes ».

2007-2010 Enseignement à l'Université de Corse en Master professionnel spécialité Qualité et Valorisation des Productions du Bassin Méditerranéen 2^{ème} année (16 heures) « Intérêts des biotechnologies en amélioration des agrumes ».

2010 Enseignement à l'Université de Corse en Master spécialité Bio ressources végétales 2^{ème} année (24 heures) « Conservation des ressources génétiques végétales et biotechnologies»

Encadrement de thèse

2004-2008 Emna Jedidi-Neji, Institut de Recherche Agronomique de Tunis (Tunisie) « Développement de méthodologies de création de mandariniers triploïdes ». Directeur de thèse Dr A Jemmali. Co-encadrant : Dr Z Bel Falah et Dr Y Froelicher.

2005-2009 Jean-Baptiste Bassene, Université de Corse « Expression phénotypique et génotypique chez les hybrides somatiques d'agrumes ». Directeur de thèse Dr R Morillon, Encadrant : Dr Y. Froelicher ; Comité de pilotage : Prof L. Berti, Prof J. Casanova, Dr P. Ollitrault, Dr C. Dhuique-Mayer.

2006-2010 Mourad Kamiri, Université de Corse « Biologie de la reproduction dans les croisements entre diploïdes et hybrides somatiques allotétraploïdes d'agrumes et implication sur la structure génétique des populations d'hybrides générées ». Directeur de thèse Dr P. Ollitrault, Encadrant : Dr Y. Froelicher ; Comité de pilotage : Prof L. Berti, Dr P. Ollitrault, Dr F. Luro

Encadrement de stagiaires (Bac +4 et Bac +5)

2001 Casanova JM. « Conservation et qualité du pollen ». Maîtrise de Biologie de l'Université de Corse.

2002 Angeli A. « Effet de l'environnement sur les phénomènes de polyploïdisation spontanés chez les Citrus ». IUP 3^{ème} année de l'Université de Corse.

2002 Costantino G. « Développement de marqueurs microsatellites chez les agrumes ». Maîtrise de l'Université de Nice.

2002 La Milza F. « Essai d'induction de cals embryogènes d'agrumes ». IUP 3^{ème} année de l'Université de Corse.

2003 Fanciullino A-L. « Héritabilité des voies de biosynthèse des composés d'arôme chez des hybrides somatiques diploïdes (alloplastés) d'agrumes ». DEA de l'Université de Montpellier II (co-encadrement avec JM Brillouet).

- 2003 Pradeau C. «Optimisation de la fécondation contrôlée chez les Citrus, Comparaison entre pollinisation manuelle et pollinisation par *Bombus terrestris* sur mandarinier Fortune ». IUP 3^{ème} année de l'Université de Corse.
- 2003 Scotto C. « Définition, caractérisation et validation de couples d'amorces microsatellites chez les agrumes ». DESS PAV. Université de Corse.
- 2004 Bassene J-B. « La création d'hybrides triploïdes : Optimisation des techniques de pollinisations contrôlées et de mini-greffages ». DESS PAV. Université de Corse.
- 2004 Bianchi M-L. « Essai d'obtention d'hybrides somatiques dans le groupe des mandariniers/clémentiniers et dans le groupe des citronniers/limettiers ». DESS PAV. Université de Corse.
- 2004 Mouhaya W. « Développement de marqueurs mitochondriaux pour la caractérisation des hybrides somatiques chez les agrumes ». DESS PAV. Université de Corse.
- 2005 Bassene JB. « Gynogenèse induite chez les mandariniers : procédure d'induction et caractérisation génétique ». Master Recherche Biomolécules. Université de Corse.
- 2005 Kerbiriou P. « Stratégies d'amélioration variétale chez les agrumes : comparaison entre différentes méthodes d'obtention d'hybrides triploïdes ». EniHP Anger 3^{ème} année.
- 2006 Kiyindou L. « Etude de la ségrégation allélique chez les hybrides somatiques de Citrus ». Master Recherche Biomolécules. Université de Corse.
- 2006 Kamiri M « Essai d'extraction des sperm cell chez les agrumes » master 2 Orléans
- 2008 El Finti A. Production d'hybrides tetraploïdes par hybridation somatique en vue de créer des triploïdes par croisement 2x x 4x chez les agrumes. Desi. Université d'Agadir
- 2010 Rossi A. « Transmission du système de reproduction dans un test cross d'hybrides somatiques » Master 2 Ingesam. Université de Corse

Encadrement de stagiaires (Bac +2 et Bac +3)

- 2006 Mattei T. « Création et sélection de triploïdes chez les mandariniers ». Licence. Université de Corse.

- 2006 Carcouet C. « Etude de la transmission des sucres et des acides organiques chez un hybride somatique citronnier + mandarinier ». INSA Rouen 3^{ème} année.
- 2006 Poulet T. « Effet du génotype femelle sur la création de triploïdes chez les mandariniers ». CNPR Toulouse 2^{ème} année.
- 2007 Casabianca S. « Création et sélection de triploïdes chez les mandariniers ». Licence. Université de Corse.
- 2007 Belzil C. « Caractérisation moléculaires d'individus issus de gynogenèse induite ». Cegep (Canada)
- 2008 Roy MC. « Caractérisation moléculaires d'individus issus d'androgenèse in vitro ». Cegep (Canada).
- 2008 Vallicioni V. « Etude de phénomène d'haploïdisation spontané chez les pamplemoussiers ». Licence Université de Corse.
- 2008 Aperre M. « Essai d'isolement de sperm cell chez le pamplemoussier ». Licence Université Toulouse.
- 2009 Masure M. « Etude d'une descendance de limettiers triploïdes ». IUT Douais.
- 2009 Groux J. « Etude de l'auto-incompatibilité de deux mandariniers ». IUT Douais.
- 2010 Iche S. « Etude de l'auto-incompatibilité d'une population en ségrégation Clémentinier x Pomelo ». IUT Digne.
- 2010 Lucciani C. « Etude des variations de ploïdie dans la descendance d'un cedratier, un mandarinier et un pamplemoussier ». Licence Université de Corse.

Encadrement et formation de chercheurs étrangers

Zina Bel Falah, INRAT (Tunisie). Formation aux techniques d'hybridation somatique chez les agrumes, 2 mois.

Ahmad El Bittar, IRAL (Liban). Formation aux techniques de culture *in vitro*, 3 semaines.

Hiyam Youssef, IRAL de TYRE (Liban). Formation aux biotechnologies des agrumes, 2 semaines.

Doris Prehn, PUC (Chili). Formation aux biotechnologies des agrumes, 2 mois.

Hanh Tran Thi, AGI (Vietnam). « Manipulation de la ploïdie chez les mandariniers », 8 mois dans la cadre du projet Corse-Vietnam.

Nabil Sabet Mustafa, NRC (Egypte). Création de triploïdes de mandariniers.

Maria-Jose Montano, PUC (Chili). Formation aux biotechnologies des agrumes, 2 mois.

Abdelhamid El Mousadik, Univ Agadir (Maroc). Formation aux biotechnologies des agrumes, 3 x10 jours.

Projets et animation

Participation au projet Géoscope 2000: Développement de marqueurs microsatellites (Cirad, CNS; coor. Cirad: AM Risterrucci)

Participation au projet de Coopération décentralisée Corse Vietnam 2003-2005 (Financement CTC, coord. INRA Luro)

Participation au projet PAI Maroc : 2005-2008: (Maroc; coor. Cirad: R Morillon)Participation au projet Interreg IIIA- 2004-2007: (CNR de Pisa, Université de Sassari; coord. C

Geri)Participation au projet Coopération bilatérale INRA Tunisie Cirad « Agrumes » (coor. Najar)

Participation au projet européen INCO – MPC 2006-2009 : (Cirad, IVIA, INRA Maroc, INRAT et INAT de Tunisie, Université de Cukurova Turquie; coor. P Ollitrault)

Développement du projet de création et sélection de mandariniers triploïdes avec les Domaines Abbes Kabbage (Maroc), 2004-2006.

Coordinateur du projet PHC Volubilis MA08/196 Maroc en 2007-2011

Participation au projet Citrusseq ANR Genome sequence, Haploid citrus genome sequencing 2009-2010

CPER Amélioration de la qualité des agrumes : Génétique et création variétale, influence du milieu 2008-2010

Co responsable du projet agropolis foundation Non-destructive quality phenotyping of mandarins 2010-2011

Animateur du groupe de travail « création et sélection de mandariniers triploïdes » avec le Cirad Martinique, Fruitworld (USA), Domaines Abbes Kabbage (Maroc).

Rédaction et promoteur d'un accord cadre DAK/Cirad 2006-2011

Liste des publications et communications

Publications

- Ollitrault P., Dambier D., **Froelicher Y.**, Bakry F. and Aubert B. 1998. Rootstock breeding strategies for the Mediterranean citrus industry ; the somatic hybridization potential. *Fruits*, 53: 335-344.
- Froelicher Y.** and Ollitrault P. 2000. Effect of the hormonal balance on *Clausena excavata* androgenesis. *Acta Horticulturae*. 535, 139-146.
- Ollitrault P, Dambier D, Vanel F and **Froelicher Y.** 2000. Creation of triploid Citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. *Acta Horticulturae*, 535, 191-197.
- Ollitrault P, Dambier D., Seker M. and **Froelicher Y.** 2000. Rootstock breeding by somatic hybridisation for the Mediterranean citrus industry. *Acta Horticulturae*. 535, 157-162.
- Ollitrault P. , Dambier D., **Froelicher Y.**, Carreel F., D'Hont A., Luro F., Bruyère S., Cabasson C., Lotfy F., Joumaa A., Vanel F., Maddi F., Treanton K. and Grisoni M. 2000. Apport de l'hybridation somatique pour l'exploitation des ressources génétiques des agrumes. *Cahiers Agricultures*, 9: 223-236.
- Ollitrault P., Dambier D., **Froelicher Y.**, Luro F. et Cottin R. 2001. Citrus diversity; organisation and exploitation by somatic hybridization. *Comptes rendus de l'Académie d'agriculture*. 86-8 : 197-221.
- Lotfy S., Luro F., Carreel F., **Froelicher Y.**, Rist D. and Ollitrault P. (2003) Development of Cleaved Amplified Polymorphic Sequence method for analysis cytoplasmic genome among *Aurantioideae* somatic hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 128, 225-230.
- Gancel AL, Ollitrault P, **Froelicher Y.**, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, & Brillouet JM (2003) Leaf Volatile Compounds of Seven Citrus Somatic Tetraploid Hybrids Sharing Willow Leaf Mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their Common Parent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 6006-60013.
- Luro F., Maddy F., Jacquemond C., **Froelicher Y.**, Morillon R., Rist D., Ollitrault P. (2004) Identification and Evaluation of Diplogyny in Clementine (*Citrus clementina*) for Use in Breeding. *Acta Horticulturae*, 663:841-848.
- Fanciullino A-L., Gancel A-L., **Froelicher Y.**, Luro F., Ollitrault P. and Brillouet J-M. (2005) Effect of Nuclear-Cytoplasmic Interactions on Aroma profile of Citrus Somatic Diploid Hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4517-4523.
- Gancel A. L.; Ollitrault P.; **Froelicher Y.**, Tomi F. , Jaquemont C., F. Luro and Brillouet J-M. (2005) Citrus somatic allotetraploid hybrids exhibit a differential reduction of leaf sesquiterpenoid biosynthesis compared with their parents. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 626-632.
- Gancel, A. L., Ollitrault, P., **Froelicher, Y.**, Tomi, F., Jacquemond, C., Luro, F. and Brillouet, J. M. (2005) Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2224-2230.
- Ocampo-Perez J, Dambier D., Ollitrault P., Coppens D'eeckenbrugge G, Brottier P., **Froelicher Y.** and Risterrucci A-M. (2006) Microsatellite markers in *Carica papaya* L.: isolation, characterization and transferability to *Vasconcellea* species. *Molecular Ecology Notes* 6: 212–217.

- Froelicher Y**, Bassene J-B, Jedidi-Neji E, Dambier D, Morillon R, Bernardini G, Costantino G, Ollitrault P (2007) Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Reports* 26:937-944
- Bassene J-B, Berti L, Carcouet E, Dhuique-Mayer C, Fanciullino A-L, Bouffin J, Ollitrault P, **Froelicher Y** (2008) Influence of Mitochondria Origin on Fruit Quality in a Citrus Hybrid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:8635-8640
- Fanciullino AL, Cercos M, Dhuique-Mayer C, **Froelicher Y**, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (2008) Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:3628-3638
- Froelicher Y**, Dambier D, Bassene J, Costantino G, Lotfy S, Didout C, Beaumont V, Brottier P, Risterucci A, Luro F, Ollitrault P (2008) Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Resources* 8:119 - 122
- Bassene J-B, Berti L, Costantino G, Carcouet E, Kamiri M, Tomi F, Dambier D, Ollitrault P, **Froelicher Y** (2009) Inheritance of Characters Involved in Fruit Quality in a Citrus Interspecific Allotetraploid Somatic Hybrid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:5065-5070
- Bassene J, **Froelicher Y**, Dhuique-Mayer C, Mouhaya W, Ferrer R, Ancillo G, Morillon R, Navarro L, Ollitrault P (2009) Non-additive phenotypic and transcriptomic inheritance in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon*: the case of pulp carotenoid biosynthesis pathway. *Plant Cell Reports* 28:1689-1697
- Engelmann F., Balsemin E., Barreneche T., Chatelet P., Chauvin J.E., Couturon E., Curk F., Dantec M.A., Dantec J.P., Dussert S., Feugey L., **Froelicher Y.**, Fouilhax L., Gamiette F., Grapin A., Grisoni M., Guérif P., Guyarder A., Label A., Luro F., Moulin B., Muller M., Peyrière A., Prigent Y., Renard M., Roux-Cuvelier M., Roques D., Rubens S., Sapotille J., Souchet C., Teyssedre D. 2009. Cryopreservation of French plant genetic resource collections (CRYOVEG) *Cryobiology*, 59 (3) : 411.
- Bassene J, **Froelicher Y**, Dubois C, Ferrer R, Navarro L, Ollitrault P, Ancillo G (online) Nonadditive gene regulation in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* Blanco and *C. limon* (L.) Burm. *Heredity* doi.org/10.1038/hdy.2009.162
- Froelicher Y**, Mouhaya W, Bassene JB, Costantino G, Kamiri M, Luro F, Morillon R, Ollitrault P (accepté) New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics & Genomes*

Chapitre d'ouvrage

- Ollitrault P., Froelicher Y., Luro F. and Yamamoto S. (2007). Seedlessness and ploidy manipulation in citrus. In *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. I. Khan Edit. CABI publishing; 197-218.
- Ollitrault P., Luro F., Dambier D. and Froelicher Y. (2008) Ploidy manipulation for seedless triploid Citrus breeding. *Plant breeding review*; 30, 323-352.

Communications orales lors de congrès

- Froelicher Y.** and Ollitrault P. 1998. Effect of the hormonal balances on *Clausena excavata* androgenesis. 1st International Citrus Biotechnology Symposium; 29 Nov. 3 Dec. 1998.
- Froelicher Y** Triploid easy peels breeding with help biotechnology. 7th international Citrus seminar improvement, Bébédouro (Brésil), 21 oct 2002.
- Luro F., **Froelicher Y.**, Costantino G. and Ollitrault P. 2003. Citrus STMS markers development and mapping. XIth Plant and animal genome conf. San Diego, Etats Unis. 11/1/03-15/1/03.
- Froelicher Y** Isolation and characterization of Citrus SSR marker on Mandarin. 10th International Citrus Congress, Agadir, Morocco, 15-20 February 2004.
- Froelicher Y.** A set of new mitochondrial PCR primers polymorphic in tropical plants. Tropical Crop Biotechnology Conference, Cairns, Australia, 16-19 August 2006.
- Froelicher Y.** Current situation of Citrus variety and rootstock research, What's new on citrus breeding? Conférence Euromed Citrusnet Agadir le 14 octobre 2008.
- Froelicher Y.** Biotechnologies interest for citrus breeding. 2nd Workshop of Société Marocaine de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SMBBM). 05 June 2008, Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia, Maroc.
- Y Froelicher,** JB Bassene, L Berti, AL Fanciullino, C Dhuique-Mayer, E Carcouet, R Morillon, P Ollitrault and Impact of a new nucleo-cytoplasmic composition on the citrus fruit quality. 11^{ème} international citrus congress. 26-30 octobre 2008, Wuhan, Chine.

Poster

- Froelicher Y.** and Ollitrault P. 1998. First results on *Clausena excavata* anther culture. Anther and pollen : from biology to biotechnology. Reims, France 9 et 10 Avril 1998.
- Ollitrault P., Dambier D., Seker M. and **Froelicher Y.** 1998. Rootstock breeding strategies for the Mediteranean Citrus industry; the somatic hybridization potential. 1st international Citrus Biotechnology Symposium; 29 Nov. 3 Dec. 1998.
- Ollitrault P., Dambier D., Vanel F. and **Froelicher Y.** 1998. Creation of triploid citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. 1st international Citrus Biotechnology Symposium; 29 Nov. 3 Dec. 1998.
- Froelicher Y.** and Ollitrault P. 1998. Effect of the hormonal balances on *Clausena excavata* androgenesis. 1st International Citrus Biotechnology Symposium; 29 Nov. 3 Dec. 1998.
- Ollitrault P., Dambier D., **Froelicher Y.**, C. Sudahono, Carreel F., D'Hont A., Luro F., Bruyère S., Lotfy S., Treanton K., Joumaa A., Cabasson C., Vanel F., Maddi F. and Rist D. 2000. Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes : VIIes Journées scientifique AUPELF-UREF , Montpellier, 3 au 5 juillet 2000.
- Ollitrault P, **Froelicher Y,** Carreel F, Bruyère S, Vanel F, Maddi F, Dambier D, D'Hont A, Lofty S, Joumaa A, Mas Camacho O, Luro F (2000) Citrus germplasm exploitation by somatic hybridization.. 9th Citrus Congress. Int. Soc. Citriculture 03-07 Décembre 2000.

- Froelicher Y.**, Lotfy S., Rist D., Luro F., Carreel F. and Ollitrault P. 2000. Development of CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) for cytoplasmic genome studies in *Aurantioideae* sub-family. 9th Citrus Congress. Int. Soc. Citriculture 03-07 Décembre 2000.
- Froelicher Y.**, Luro F. and Ollitrault P. 2000. Analysis of meiotic behavior of the tetraploid species *Clausena excavata* by molecular marker segregation studies. 9th Citrus Congress. Int. Soc. Citriculture 03-07 Décembre 2000.
- Y. Froelicher**, D. Dambier, G. Costantino, S. Lotfy, C. Didout, V. Beaumont, F. Luro, P. Brottier, A. M. Risterucci and P. Ollitrault (2003) Development of Single Tagged Microsatellite Sequence (STMS) for networking management of citrus germplasm. Congrès ISPBM, Barcelone 23-28 juin 2003.
- Lotfy S, F. Luro, **Y. Froelicher**, A.M. Risterucci, D. Filloux and P. Ollitrault (2003) Development of microsatellite markers for chloroplastic genome studies in Citrus. Congrès ISPBM, Barcelone 23-28 juin 2003.
- Froelicher Y.**, Costantino G., Dambier D., Lotfy S., Scotto C., Didout C., Beaumont V., Luro F., Brottier P., Risterucci A.M. and Ollitrault P. 2004. Isolation and characterization of Citrus microsatellites for networking germplasm management and gene mapping. Xèmes Journées de la Société Internationale de Citriculture, Agadir, Maroc, 16-20 Février 2004.
- Luro F., Costantino G., Scotto C., Vila M., Ollitrault P., Risterucci A.M. and **Froelicher Y.**, 2004. -Development and use of microsatellites markers for the analyse of genetic diversity of citrus in the SRA INRA-CIRAD germplasm. In : 4. Congrès International Environnement et Identité en Méditerranée, Université de Corse, Corte, 19-25 Juillet 2004.
- Bouffin J., Dambier D., **Froelicher Y.**, Luro F., Fanciullino A.L. , Gandoin J.M., Paolacci V., and Ollitrault P. 2005. First evaluation of a cybrid lemon in Corsica. 7th International Congress of Citrus Nurserymen (ICCN), Le Caire Egypt, 17 - 21 Septembre, 2005.
- Froelicher Y.**, Bouffin J., Dambier D., Le Bellec F., Bruyère S., Lavigne C., Pancarte C., Bassene J-B., Vanh Tran H. and Ollitrault P. 2005. The triploid breeding program at CIRAD. 7th International Congress of Citrus Nurserymen (ICCN), Le Caire Egypt, 17 - 21 Septembre, 2005.
- Bassene JB., Ollitrault P., Jedidi E., Bernardini G., Costantino G., Morillon R. and **Froelicher Y.** 2006 Induced parthenogenesis in monoembryonic mandarin. XV (Federation of European Societies of Plant Biology congress, Lyon (France) 17-21 Juillet.
- Froelicher Y.**, Bouffin J., Dambier D., Le Bellec F., Bruyère S., Lavigne C., Pancarte C., Bassene J-B., Vanh Tran H. and Ollitrault P. 2005. The triploid breeding program at CIRAD. 7th International Congress of Citrus Nurserymen (ICCN), Cairo Egypt, Sept. 17 - 21, 2005.
- Bouffin J. , Dambier D., **Froelicher Y.**, Luro F., Fanciullino A.L. , Gandoin J.M., Paolacci V., and Ollitrault P. 2005. First evaluation of a cybrid lemon in Corsica. 7th International Congress of Citrus Nurserymen (ICCN), Cairo Egypt, Sept. 17 - 21, 2005

- Luro F., Argout X., Costantino G., **Froelicher Y.**, Terol J., Agusti J., Alos E., Andres F., Brumos J., Carillo Colmenero J. M., Conejero V., Conesa A., Iglesias D., Legaz F. 3, Navarro L., Soler G., Tadeo F., Talon M., Courtois B., Dossat C., Winckler P., Ollitrault P. and Morillon R. . Polymorphism And Position Analysis Of Dinucleotide And Trinucleotide Microsatellite Sequences Detected In Citrus Clementine cv. EST Sequences., 2006. XIVth Plant and animal genome conf. January 14-18, 2006. San Diego, Etats Unis.
- Lavigne C., Pancarte C., **Froelicher Y.** and Ollitrault P. 2007. Creation and selection of mandarin type triploid hybrids for tropical wet area. In : Fruticultura, La Havane, Cuba, 17-21 septembre 2007. - s.l. : s.n..
- Luro F., Costantino G., Billot C. , **Froelicher Y.**, Morillon R., Ollitrault P., Terol J., Talon M., Gmitter F.G. Jr. and Chen C. (2007). Genetic Maps Of Clementine Mandarin And Intergeneric Hybrid Clementine X Poncirus Using Genomic and EST Microsatellite Markers. Plant and Animal Genome Congress, San Diego, USA.
- Bassene J.B., Ollitrault P., Berti L., Dhuique-Mayer C., Bouffin J., Morillon R. and **Y. Froelicher.** 2008. Evaluation of fruit quality in a lemon cybrid with mandarin mitochondria. EUCARPIA 18th General Congress Modern Variety Breeding for Present and Future Needs. 9-12 September 2008, Valencia, Spain.
- Dambier D., Pensabene-Bellavia G., **Froelicher Y.**, Aka Kacar Y., Benyahia H., Belfalah Z., Navarro L., and P. Ollitrault. 2008. Creation of new intergeneric and interspecific somatic hybrids; an objective of the 6th PCRD European Project 'CIBEWU' to face the Mediterranean Citrus Rootstock Challenge. 11th International Citrus Congress. October 26-30, 2008. Wuhan, China.
- Hussain S., Mouhaya W., Costantino G., Urban L., **Froelicher Y.**, Ollitrault P., Morillon R. and François Luro. 2008. Genetic strategy for identification of genes involved in citrus salt stress tolerance: status of genome mapping program. EUCARPIA 18th General Congress Modern Variety Breeding for Present and Future Needs. 9-12 September 2008, Valencia, Spain
- Kamiri M., Ollitrault P., Srairi I. and **Y. Froelicher.** 2008. Microsatellite loci inheritance in a Citrus interspecific somatic hybrid. EUCARPIA 18th General Congress Modern Variety Breeding for Present and Future Needs. 9-12 September 2008, Valencia, Spain
- Ollitrault P., Lotfy S., Costantino G., Federici CT., Mu L., Chen C., Kacar Y., Ollitrault F., Mar Ferrer R., Terol J., **Froelicher Y.**, Morillon R., Billot C., Talon M., Navarro L., Roose M.L., Gmitter F.G., and F. Luro. 2008. International effort toward a SSR-based linkage map for *C. clementina*. 11th International Citrus Congress. October 26-30, 2008. Wuhan, China.
- Kamiri M., Srairi I., Ollitrault P., **Froelicher Y.** 2009. Origin of different ploidy levels of progeny from diploid x tetraploid somatic hybrid crosses in Citrus In : International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, May 17 - 20, 2009, Saint-Malo, France
- Ollitrault P., Bassene J.B., Gancel A.L., Morillon R., Dambier D., Gema Ancillo G., Navarro L., **Froelicher Y.** 2009. Interspecific and intergeneric somatic hybrids with *C. deliciosa*

Ten. enlightens non additive inheritance in allotetraploid citrus In : International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, May 17 - 20, 2009, Saint-Malo, France

Résumé :

Amélioration génétique des agrumes, gestion de la diversité et de la ploïdie

Les agrumes représentent une richesse particulièrement importante pour l'humanité, tant du point de vue nutritionnel, qu'économique ou culturel. Ils constituent la première production mondiale fruitière avec 122 millions de tonnes en 2008. Le marché du petit fruit de type clémentine / mandarine est particulièrement dynamique puisque la production est passée en 10 ans de 18 à 27 millions de tonnes. Le bassin méditerranéen constitue aujourd'hui la première zone de production de ce type de fruit. Depuis une vingtaine d'année, le Cirad a engagé un programme d'amélioration des agrumes dans ce groupe de fruits. Les agrumes reposent sur un système de reproduction complexe, pouvant se manifester par de la reproduction sexuée, de l'apomixie, un système d'auto-incompatibilité gamétophytique et des gènes de stérilité nucléaire et cytoplasmique. De plus, même si les agrumes sont considérés comme étant majoritairement diploïdes, des variations du niveau de ploïdie sont fréquemment observées dans les semis chez de nombreuses variétés.

Le travail d'améliorateur repose sur une parfaite connaissance des ressources génétiques. Le développement d'outils moléculaires nucléaires SSR et mitochondriaux a permis de préciser la structuration de la diversité génétique et l'origine des espèces cultivées. Ainsi nous avons pu montrer l'existence de deux sous-groupes au sein des mandariniers. L'un de ces groupes a fourni son cytoplasme à de nombreux hybrides, utilisés en tant que porte-greffes, et l'autre est à l'origine des variétés cultivées. Cette meilleure connaissance des ressources génétiques nous permet de mieux raisonner nos schémas de création. Le premier critère de sélection retenu est la stérilité des variétés afin d'obtenir des fruits sans pépin. La triploïdie permet de générer de la variabilité tout en assurant une stérilité à la fois mâle et femelle. Ces dernières années, le développement des biotechnologies, a fourni de nouveaux outils à l'améliorateur. Le développement de techniques de biologie cellulaire permet aujourd'hui de manipuler efficacement la ploïdie chez les agrumes, débouchant sur l'obtention d'hybrides somatiques, des cybrides, de plantes haploïdes et polyploïdes. Les hybrides triploïdes obtenus dans le groupe des mandariniers alimentent notre programme de sélection de fruits de qualité, sans pépin et d'épluchage facile. Près de 5000 triploïdes sont actuellement en cours d'évaluation dans le cadre d'un réseau en partenariat. Ce matériel est également devenu l'objet de recherches cognitives, en particulier sur la transmission des caractères impliqués dans la qualité des fruits. Il soulève ainsi de nouvelles questions de recherche sur l'expression du génome et l'hérédité des caractères chez les hybrides polyploïdes d'agrumes.