

Triploïdie : une perspective pour l'amélioration génétique des agrumes

Handaji N.¹, Ollitrault P.² Arsalane N.¹ et Hmouni D.¹

¹Institut National de la Recherche Agronomique. Laboratoire de Biotechnologie. B.P 1055. Kénitra, Maroc

²Centre International de Recherche Agronomique et développement, CIRAD FLHOR Montpellier, France

Résumé

Le secteur des agrumes constitue une composante de l'économie mondiale la plus importante tant en valeur qu'en volume. Il occupe la première place des productions fruitières à raison de tonnes. Ces dernières années et suite à la libéralisation des échanges commerciaux, la qualité des fruits frais de table des agrumes est devenue la principale préoccupation des agrumiculteurs en raison qu'elle représente le facteur déterminant de la valeur commerciale de la production au niveau des marchés d'exportations. Par conséquent, ces dispositions peuvent perturber la commercialisation des agrumes et en particulier le groupe des petits fruits. La qualité des fruits est définie par de nombreux critères qui diffèrent d'un pays à un autre.

Parmi les différentes méthodes d'amélioration génétique des agrumes, la création des variétés triploïdes ($2n=3x=27$) représente une voie extrêmement prometteuse. En effet, les variétés triploïdes sont, en général, stériles, elles présentent une plus grande vigueur et une taille de fruit supérieure aux variétés diploïdes.

Plusieurs voies exploratoires sont développées actuellement à l'échelle mondiale pour obtenir des hybrides triploïdes :- des croisements entre des variétés tétraploïdes et diploïdes, - la culture in vitro des tissus d'albumen triploïdes, - la fusion de protoplastes entre cellules haploïdes et diploïdes et - la sélection des triploïdes dans les descendances de croisements entre parents diploïdes par production de $2n$ gamètes.

C'est cette dernière voie que L'Institut National de la Recherche Agronomique (Programme agrumes El Menzeh) a appliqué pour la première fois pour la création de nouvelles variétés triploïdes de mandariniers aspermes et ce depuis l'année 1996. En effet, 70 hybrides triploïdes (identifiés par cytométrie en flux au CIRAD FLHOR France) ont été obtenus par des

croisements entre parents diploïdes (mandariniers et clémentinier). Ces triploïdes sont en cours d'évaluation pour d'autres caractères qualitatifs et quantitatifs que nous proposons d'exploiter dans le cadre de ce projet.

Mots clés : Agrumes, Ploïdie, Triploïdie, Amélioration génétique, Culture in vitro, Cytométrie en flux

Abstract : Triploidy - a perspective for Citrus genetic improvement (bibliographic review)

Recently, the consumer is becoming very demanding for high quality product. For citrus production, the most demanded criteria are seedless citrus fruit, easy to peel and fruit size. So, one of the most promising methods for obtaining seedlessness for Fresh fruit cultivars is the constitution of triploids plants ($2n=3x=27$). The basic haploid chromosome number in citrus and its closely related genera is 9, nearly all varieties are diploid with a $2n$ number of 18. In citrus breeding, it's very important to obtain triploids hybrids with seedless fruit by several methods as follow : - Diploid crosses ($2n \times 2n$), - Female tetraploid with male diploid crosses ($4n \times 2x$), - Female diploid and tetraploid male crosses ($2n \times 4n$), - Somatic embryogenesis in vitro from endosperm derived calli, - Somatic hybridization is a promising way to produce high percentage of hybrids triploids.

Key words : Citrus, ploidy, triploid, improvement, tissus culture, fly cytometer

ملخص : الثلاثية الصبغيات : منظور لتحسين الوراثي عند الحوامض (دراسة بيبليوغرافية)

منداجي ن.1، اوليتروت ب.2، ارسلان ن.1 و حموني إ.1

1 المركز الجهوي للبحث الزراعي، المنزه، القنيطرة، المغرب

2 مختبر دراسة وقاية النباتات، كلية العلوم، جامعة ابن طفيل، القنيطرة، المغرب

تعتبر زراعة الحوامض من أهم المجالات الاقتصادية والاجتماعية، وللإستجابة لمتطلبات السوق والمستهلكين أصبح التحسين الوراثي للحوامض من الضروريات الملحة. ولذا فإن البحث للحوامض وانتقاء فصائل ثلاثية الصبغيات ($27=3x=2n$) يعد من أحسن الطول للحصول على فواكه تتوفر على أحسن الميزات، كغياض البنور بالإضافة إلى ميزات أخرى حسب نجاح تقنية التهجين المستعملة.

في هذه الدراسة البيولوجرافية، سنتطرق إلى بعض التقنيات للحصول على هجانن ثلاثية الصبغيات عند الحوامض. انطلاقاً من طرق التهجين التقليدية وضولاً إلى أحدث التقنيات البيوتكنولوجية.

الكلمات المفتاحية : الحوامض، ثلاثية الصبغيات، التحسين الوراثي، التهجين، بيوتكنولوجيا

Introduction

Les agrumes sont originaires du sud-est asiatique, selon Tanaka (1954), le centre primitif couvrirait l'Assam et le nord de la Birmanie, le nord de l'Inde, et le sud de la Chine (Gmitter et Hu, 1990). Les branches phytogénétiques ont été diffusées de la Chine centrale au Japon, de l'est Indien à la Nouvelle Guinée et à l'Australie, et à travers les sous continents de l'Inde et de l'Afrique Tropicale (Swingle et Reece, 1967 et Soost et Cameron, 1975). Ils se sont répandus dans le bassin méditerranéen sous l'influence des portugais. Cette diffusion a défini une nouvelle aire de culture des agrumes sous un climat estivale aride et des températures hivernales pouvant être inférieures à 0°C. De ce fait, les agrumes se caractérisent par une grandes capacité d'adaptation aux conditions climatiques.

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutaceae et correspondent à 11 genres différents dont trois sont les plus importants, *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus* (Swingle et Reece, 1967).

Genre Poncirus

Le *Poncirus* est monospécifique notamment, le *Poncirus trifoliata* (Linn.) est un petit arbre très épineux et à feuilles trifoliolées et caduques pendant la mauvaise saison. Les fruits, presque sessiles sont impropres à la consommation. Par des hybridations le *Poncirus trifoliata* a donné de nombreux hybrides utilisés comme porte-greffe (Citrange, Citrumelos).

Genre Fortunella

Les *Fortunella* correspondent à des arbustes épineux, à feuilles simples et persistantes. Leurs fruits sont très petits et comestibles. Les espèces les plus connues sont : *F. japonica* (Swingle) et *F. margarita* (Swingle). Par croisement intergénériques, les Kumquats ont donné de nombreux hybrides (lime-quats, citrangequats,...).

Genre Citrus

Les *Citrus* sont des arbustes épineux à feuilles simples, persistantes, à pétiole ailé, et dont le limbe, suivant les espèces, est ou n'est pas articulé sur le pétiole.

Dans le genre *Citrus*, on a deux grandes classifications. Celle de Tanaka (1961), qui comprend 156 espèces et celle de Swingle et Reece (1967), où on ne distingue que 16 espèces. Les trois genres composants les agrumes possèdent le même nombre de chromosomes ($2n=18$), ce qui a favorisé les croisements intergénériques et interspécifiques. Cette large possibilité d'hybridation et parmi les causes de cette divergence systématique (Barrett et Rhodes, 1976 ; Cottin, *et al.*, 1997).

Amélioration génétique des agrumes

En général, l'amélioration génétique des plantes est basée sur la détermination des objectifs qui, avec le choix d'une source appropriée du matériel végétal et d'une méthode, conditionnera la réussite du sélectionneur (Schnell, 1981). Son objectif principal est la création de nouvelles variétés plus performantes chez l'agriculteur et répondant mieux aux exigences des transformateurs et des consommateurs. Elle doit également rassembler, conserver, améliorer la variabilité génétique des espèces pour sauvegarder les ressources génétiques.

L'amélioration génétique des agrumes est complexe à cause de nombreuses contraintes biologiques, parmi d'autres, la polyembryonie, la longueur de la phase juvénile, la stérilité gamétique, l'incompatibilité et l'absence de certains critères précoces de la plupart des caractères agronomiques (Ollitrault, 1992). Les méthodes d'amélioration sont très nombreuses et elles sont définies selon les moyens disponibles et les objectifs des sélectionneurs. Il s'agit notamment de la sélection clonale, de l'hybridation sexuelle, des mutations induites et des manipulations de la ploïdie. Les méthodes traditionnelles d'amélioration des plantes consistent à manipuler, à un niveau déterminer de ploïdie, la variabilité qui existe déjà à l'intérieur des ressources génétiques de chaque espèce cultivée. A l'intérieur de ces limites, le sélectionneur cherche à modifier les fréquences de gènes, en tenant compte des méthodes de reproductions naturelles, afin d'obtenir les meilleurs avantages possibles du point de vue économique. Il en résulte de nouvelles lignées fixées, des hybrides ou des clones de meilleure qualité.

Les critères de sélection sont très nombreux et ils diffèrent selon la nature du génotype ; des cultivars ou des porte-greffes. Pour les cultivars, la qualité des fruits est devenue le critère essentiel pour déterminer le prix du marché extérieur. Il s'agit des qualités organoleptiques (arômes, teneur en sucre et acidité) et des qualités pomologiques (coloration, calibre, facilité d'épluchage, aspermie). Cependant, la majorité des variétés à fruits frais du groupe de mandarine et ses hybrides présentent de nombreux pépins, d'où l'intérêt de chercher de nouvelles variétés stériles et aspermes permettant de mieux se positionner au niveau du marché mondial. La combinaison des caractères désirables dépend du choix des parents à l'exception de l'aspermie. La recherche des fruits sans pépins est obtenue selon certaines voies, à savoir les remaniements chromosomiques, l'auto-incompatibilité combinée avec la parthénocarpié et l'irradiation des graines ou des bourgeons. Des études de mutagenèse par irradiation ont été faites sur les *Citrus sinensis* et *Citrus paradissi* et les fruits obtenus sont aspermes (Hensz, 1977; Hearn, 1984, 1986). Selon Ollitrault (1992), la triploïdie, est l'une des meilleures stratégies pour obtenir de l'aspermie chez les agrumes. C'est cette dernière voie qui fait l'objet de la présente synthèse bibliographique.

Triploïdie chez les agrumes ($2n=3x=27$)

Tous les agrumes et genres apparentés ont un nombre de chromosomes de base $n=9$, avec une prédominance du niveau diploïde chez toutes les espèces cultivées ou sauvages (Soost et Cameron, 1969). Mais il existe, cependant une très faible fréquence des polyplloïdes spontanés comme les triploïdes lime Tahiti et Bears ($2n=3x=27$). Certains aneuploïdes à nombre de chromosomes variant de 19 à 41 ont été identifiés par Krug (1943) et Esen et Soost (1972).

Ces aneuploïdes présentent un matériel prometteur pour les études cytogénétiques, mais sans intérêt commercial.

La triploïdie offre aux améliorateurs des agrumes une opportunité de combiner l'aspermie, la vigueur, la production, la précocité et autres caractères désirables selon le choix des parents (Frost, 1943 ; Esen et Soost, 1971). Soost et Cameron (1975) rapportent que les triploïdes sont vigoureux, productifs et présentent des fruits sans pépins. La stérilité gamétique qui caractérise les hybrides triploïdes est expliquée par un déséquilibre chromosomique lors du développement embryogénique de l'ovule (Fatta Del Bosco *et al.*, 1992). Cet avortement méiotique offre l'avantage de supprimer les pépins des fruits.

Plusieurs voies exploratoires ont été développées à l'échelle mondiale pour obtenir des hybrides triploïdes et dont le schéma général est présenté dans la figure 1.

Recherche des triploïdes spontanés

Plusieurs hybrides triploïdes spontanés sont obtenus par les croisements entre les diploïdes (Esen et Soost, 1977 ; Oiyama et Okudai, 1983). Dans ce cas, les triploïdes sont issus de la fusion de gamètes femelles non réduits et de gamètes mâles réduits (Esen et soost, 1971). Par conséquent, le parent femelle est responsable de la détermination du taux d'induction spontanée de la triploïdie qui est lié au taux de la production de mégaspores non réduits (Esen et Soost, 1971 ; Geraci *et al.*, 1975, 1976 et 1982). La probabilité d'obtenir des hybrides triploïdes d'agrumes spontanément est supérieur à 5% (Esen et Soost, 1971). La fréquence de gamète femelle non réduit varie suivant les génotypes de moins 1% à près de 20% (Ollitrault, 1992). Par ailleurs, la taille des graines est très corrélée avec le niveau de ploïdie. En effet, la dimension des graines, portant des embryons triploïdes, de l'ordre du 1/3 à 1/6 est plus petite que celle portant des diploïdes (Esen et Soost 1973; Starrantino et Reforgioto, 1981 ; Geraci *et al.* ; 1975 et Oiyama et Okudai, 1983). Geraci (1978) a rapporté que les embryons triploïdes issus des parents monoembryonnés et auto-incompatibles sont facilement identifiables mais avec un pourcentage d'obtention très faible. De plus, la polyembryonie des parents femelles, l'auto-compatibilité et la stérilité gamétique, de certains cultivars élites, rendent la recherche des hybrides triploïdes d'agrumes très difficile à réaliser.

Croisement entre les tétraploïdes et les diploïdes

Depuis longtemps, de nombreux hybrides triploïdes issus des croisements entre les tétraploïdes et les diploïdes ont été obtenus (Frost, 1943 ; Russo et Torrisi, 1953 ; Tachikawa *et al.*, 1961 ; Esen et Soost, 1973). Mais, le facteur limitant de l'exploitation complète de cette voie était l'absence des géniteurs tétraploïdes.

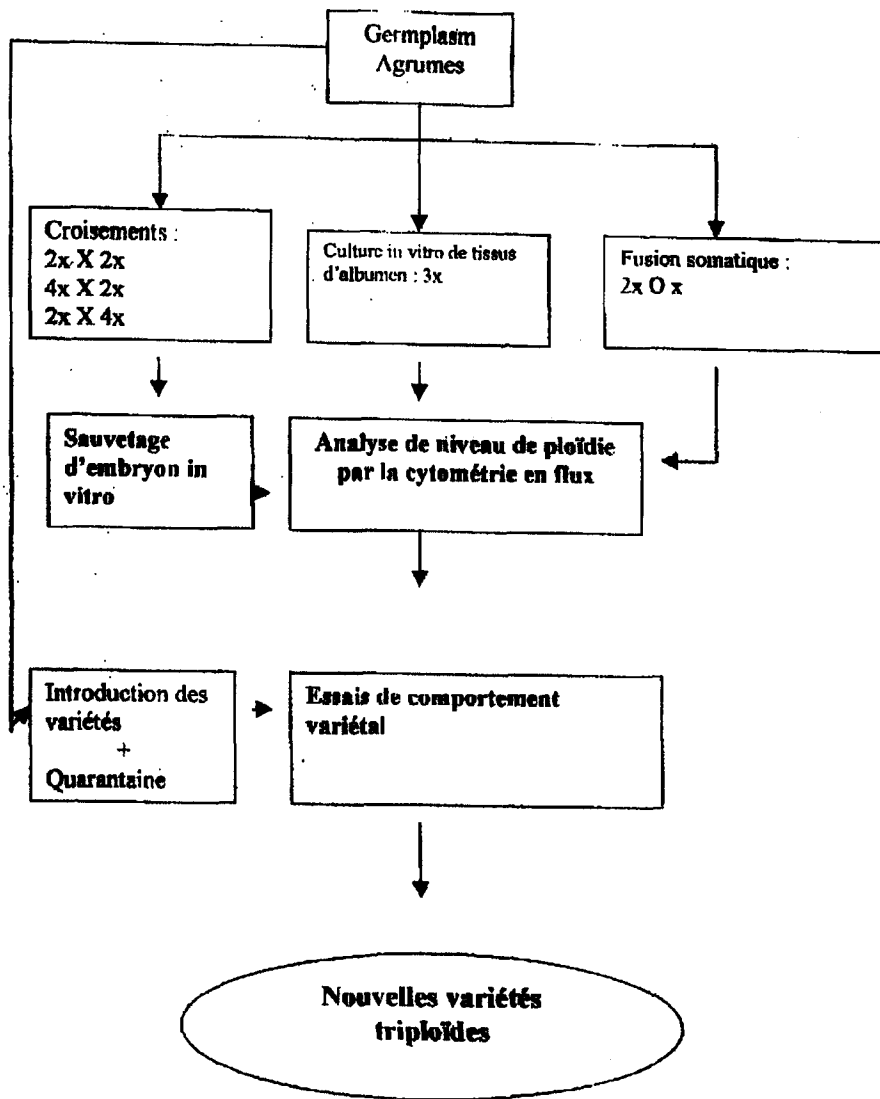


Figure 1. Schéma général de la création des variétés triploïde chez les agrumes

Deux cas possibles de croisement ont été rapportés. Quand le parent femelle est tétraploïde et polyembryonné, il est difficile de distinguer entre les embryons nucellaires et les embryons triploïdes, et quand le parent mâle est tétraploïde, les embryons triploïdes sont très peu viables (Esen et Soost, 1972). Par ailleurs, le croisement $4x \times 2x$, où le parent femelle est tétraploïde monoembryonné a donné de meilleurs résultats par rapport au croisement réciproque. Le développement des embryons triploïdes issus du premier croisement est normal en raison du niveau de ploïdie dans les tissus endospermiques (3 : 5) (Soost et Cameron, 1975 et Ollitrault, 1992).

Les techniques de culture in vitro ont été utilisées pour le sauvetage des embryons triploïdes immatures issus des croisements entre les diploïdes et/ou avec les tétraploïdes (Starrantino, 1982 ; Starrantino et Recupero, 1982).

Les tétraploïdes se caractérisent par une faible production et une mauvaise qualité. De ce fait, ils ne peuvent servir que dans un programme de création de nouvelles variétés triploïdes. Plusieurs mécanismes sont possibles pour produire des tétraploïdes :

□ dans des semis des graines polyembryonnées, la fréquence des tétraploïdes spontanés varie de 1% à 3% (Ollitrault, 1992). Ces auto-tétraploïdes sont issus d'un doublement des tissus nucellaires de l'ovule (Cameron et Frost, 1968),

□ l'application de la colchicine, in vivo, sur les bourgeons axillaires (Barrett, 1974), ou in vitro, sur les ovules non fécondés et les cals embryogéniques, permet l'obtention des auto-tétraploïdes (Gmitter et Ling, 1991 et Gmitter *et al.*, 1991). En plus, le traitement par la colchicine combiné avec le greffage a donné des résultats rapides (Grosser et Gmitter, 1990c),

□ la fusion des protoplastes diploïdes permet d'augmenter le taux de production des allo-tétraploïdes. Ces derniers sont hétérozygotes, très vigoureux et très productifs que les auto-tétraploïdes (Grosser *et al.*, 1992 et Tusa *et al.*, 1992).

Culture in vitro des tissus d'albumen (3n)

Comme la plupart des Angiospermes diploïdes, les agrumes présentent des graines à tissus d'albumen triploïdes (3n). Ce tissu provient de l'union des deux noyaux polaires et l'un des deux noyaux spermatiques. Le nombre de chromosomes dans l'endosperme reste stable au cours de toute les phases de régénération de la plante (Gmitter et al., 1990). La régénération des plantes triploïdes à partir des cals endospermiques permet de soulever les barrières d'hybridations sexuelles (Gao *et al.*, 1989). En général, les lignées embryoniques qui continuent à proliférer 18 mois après induction sont des triploïdes (Gmitter *et al.*, 1990). Peu de travaux ont été faits dans ce domaine, car l'isolement des tissus d'albumen des tissus nucellaires nécessite une maîtrise des techniques de culture.

Hybridation somatique

Chez les agrumes, les plantes haploïdes ne présentent aucun intérêt commercial, mais ils jouent un rôle majeur aussi bien pour les études cytogénétique que pour la production des triploïdes par la fusion somatique.

Plusieurs hybrides somatiques ont été obtenus à partir des combinaisons interspécifiques (Kobayashi *et al.*, 1988 ; Grosser *et al.*, 1989 ; Ohgawara *et al.*, 1989 et Tusa *et al.*, 1990), des combinaisons intergénériques entre les espèces compatibles (Ohgawara *et al.*, 1985 ; Grosser *et al.*, 1988a ; Grosser et Gmitter, 1990a) et des combinaisons entre les espèces incompatibles. (Grosser *et al.*, 1988b et Grosser *et al.*, 1990, et Grosser, 1990).

Les hybrides somatiques triploïdes sont issus de la fusion des protoplastes haploïdes et d'autres diploïdes. Les géniteurs allotétraploïdes utilisés dans un croisement contrôlé avec un diploïde pour la création des triploïdes peuvent être obtenus de la fusion somatique entre les cellules diploïdes (Grosser *et al.*, 1992, 1994). Ces fusions de protoplastes élargissent ainsi considérablement les potentialités de l'hybridation sexuée.

Estimation du niveau de ploïdie et identification des triploïdes

En général, la ploïdie peut être déterminée soit par les méthodes conventionnelles basées sur le comptage du nombre de chromosomes effectué dans les phases mitotiques des cellules méristématiques. Ce nombre est ensuite comparé à celui d'une plante témoin (Petit *et al.*, 1986). D'autres méthodes indirectes peuvent être des indicateurs de la ploïdie. Elles se basent sur le comptage du nombre de chloroplastes, la taille et la densité des stomates, le diamètre et la fertilité des graines de pollen (Mergea *et al.*, 1997). Cependant, ces méthodes classiques sont imprécises, fastidieuses et très longues, soit par les méthodes modernes basées sur l'utilisation du cytomètre de flux qu'est un appareil très récent mais coûtant très cher.

Le principe d'un cytofluoromètre (ou cytométrie de flux) est de faire défiler, dans un jet liquide, les cellules qui vont interpréter un rayon laser, une à une, à raison de plusieurs milliers par seconde. Elle permet la détermination rapide de la quantité d'ADN dans le noyau cellulaire de la plante, et ensuite de trier les individus selon leur niveau de ploïdie (Prévo, 1985 ; Petit *et al.*, 1986 et Anonyme, 1991). L'analyse de l'ADN nucléaire par la cytométrie de flux exige l'utilisation d'un perméant (Triton) pour faciliter la pénétration du colorant (fluorescent) spécifique qui se fixe sur l'ADN chromosomique, permettant ainsi la quantification et le dénombrement des chromosomes. La présence de témoin, diploïde triploïde ou tétraploïde, pour étalonnage est nécessaire pour augmenter la fiabilité des résultats. Par ce moyen, les analyses sont précises et rapides (Tableau 1)

Tableau 1. Comparaison de l'efficacité des techniques utilisées pour l'évaluation de la ploïdie (Anonyme, 1991)

Techniques utilisées	Temps	Fiabilité	Coût
Comptage chromosomique	15 plants/heure	élevée	faible
Méthodes indirectes	35 plants/heure	moyenne	faible
Cytométrie en flux	30-40 plants/heure	élevée	moyen
Identification phénotypique	Rapide	faible	faible

Conclusion

Il ressort de cette synthèse bibliographique que la ploïdie contribue dans l'amélioration génétique des agrumes. En effet, les variétés triploïdes sont stériles et présentent une plus grande vigueur et une taille de fruits supérieure aux variétés diploïdes. Ces qualités pomologiques permettent de diminuer le taux de triage, d'augmenter le niveau de production et de rendre le marché national plus compétitif vis-à-vis de ces concurrents.

Pour produire des triploïdes, plusieurs approches ont été mises en évidence. Cependant, le recours aux méthodes traditionnelles, et malgré leurs défauts, continueront dans le futur avec l'espoir de trouver de nouvelles stratégies plus performantes. La biotechnologie a joué un rôle fondamental dans l'amélioration génétique des variétés d'agrumes aspermes. Parmi celle-ci, la technique de cultures *in vitro* (sauvetage d'embryon, embryogenèse somatique et fusion somatique) contribue pour une large part dans le processus d'amélioration génétique des variétés d'agrumes aspermes. La difficulté de produire des triploïdes dans les descendance des variétés diploïdes ou des croisements entre les diploïdes et les tétraploïdes, a été surmontée par la germination *in vitro* des embryons immatures dans des milieux de culture appropriés. Aussi, la production directe des triploïdes par l'embryogenèse somatique et la fusion somatique, sont des voies prometteuses permettant de surmonter certaines contraintes génétiques. L'application de toutes ces techniques, à l'échelle mondiale, pour la création de variétés triploïdes d'agrumes montre l'intérêt que présente le niveau de ploïdie dans l'amélioration variétale et présage avenir prometteur pour l'amélioration génétique des agrumes.

L'Institut National de la Recherche Agronomique (Centre Régional à Kénitra El Menzeh) a entamé pour la première fois le programme de création de nouvelles variétés triploïdes de mandariniers aspermes et ce depuis l'année 1996. En effet, 70 hybrides triploïdes (identifiés par cytométrie en flux au CIRAD FLHOR France) ont été obtenus par des croisements entre parents diploïdes (mandariniers et clémentinier). Ces triploïdes sont en cours d'évaluation pour d'autres caractères qualitatifs et quantitatifs.

Références bibliographiques

- Anonyme, A., 1991. Cytométrie en flux : application à l'analyse de la ploïdie chez les végétaux. *Tech-noscope*. Biofutur.47 : 3-11.
- Barrett, H.C. 1974. Colchicine-induced polyploidy in Citrus. *Bot. Gaz.* 135 : 29-41.
- Barrett, H.C. et Rhodes, A.M. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Syst. Bot.* 1 : 105-136.
- Cameron, J.W. et Frost, H.B., 1968. Genetics, breeding, and nucellar embryony. In: Reuther, W. Web-ber, H.J. and Batchelor, L.D. eds. *The Citrus Industry*. 2. University of California Press. Berkeley.
- Cottin, R., Ahlawat, V.S., Anderson, C., Aubert, B., Ezzoubir, D., Gmitter, F., Jacquemond, C.J.P., Nadori, E.B., Navarro, L., Protopapadakis, E., Reforgiao- Rucupero, G., Tuzcu, O., et Zaragaza, L. 1997. Les agrumes dans le monde : un annuaire du genre Citrus. S.R.A. San Nicolao. 1/1997. 64p.

- Esen, A. et Soost, R.K., 1971. Unexpected triploid in Citrus : their origin, identification and possible use. *The journal of Heredity*. 62 : 329-333.
- Esen, A. et Soost, R.K., 1972. Aneuploidy in Citrus. *Amer. J. Bot.* 59 : 473-477.
- Esen, A. et Soost, R.K., 1973. Seed development in Citrus with special reference to 2x X 4x crosses. *Amer. J. Bot.* 60 : 448-462.
- Esen, A. et Soost, R.K., 1977. Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo : endosperm ploidy ratio in Citrus. In : I congreso mundial de citricultura. 1973* (O. Carpena, ed). Murcia. Valencia. Vol II : 53-63.
- Fatta Del Bosco, S.; Matranga, G. ; et Geraci, G., 1992. Micro and macro-sporogenesis of two triploid hybrids of Citrus. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 122-124.
- Frost, H.B. 1943. Genetics and breeding. p817-913. In Webber, H.J and Batcheloi (ed). *The Citrus industry*. Vol. 1. Univ. Calif. Press. Berkeley and Los Angeles.
- Gao, F. Shang, F.R., Wu, A.R., et Chen, S., 1989. Production of triploid plantlets by in vitro culture of Citrus embryos. *Hereditas Beijing*. 10 : 6.9-11.
- Geraci, G. 1978. Percentage of triploid offspring of cross-pollinated diploid polyembryonic Citrus. *Proc. Int. Soc. Citriculture*. 57-58.
- Geraci, G. ; Esen, A. et Soost, R. K., 1975. Triploid progenies from 2x X 2x crosses of Citrus cultivar. *The journal of Heredity*. 66 : 177-178.
- Geraci, G. ; De Pasquale, F., et Tusa, N., 1976. Incidenza della triploidia su alcune cultivar diploidi di mandarini e limoni. *Riv. Ortoflorofrutt. Italiana*. 60 : 127-131.
- Geraci, G, Starrantino, A., Reforgiato Recupero, G.; et Russo, F., 1982. Spontaneous triploidy in progenies of monoembryonic hybrids of clementine Comune X King of Siam. *Genet. Agr.* 36 : 113-118.
- Gmitter, F.G. Jr. et Hu, X., 1990. The possible role of Yunnan, China in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae). *Econ. Bot.* 44 : 267-277.
- Gmitter, F.G. Jr. et Ling, X., 1991. Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped Citrus ovules treated with colchicine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116 : 317-321.
- Gmitter, F.G. Jr. Ling, X. B. ; et Deng, X. X., 1990. Induction of triploid Citrus plants from endosperm calli in vitro. *Theor. Appl. Genet.* 80 : 785-790.
- Gmitter, F.G. Jr. Ling, X., Cai, C., et Grosser, J.W., 1991. Colchicine induced polyploidy in Citrus embryogenic cultures, somatic embryo and regenerated plantlets. *Plant. Sci.* 74 : 135-141.
- Grosser, J.W., 1990. Citrus rootstock improvement by cell fusion. *Citrus. Vege. Mag.* 9 : 28-32.
- Grosser, J.W., et Gmitter F.G. Jr., 1990a. Somatic hybridization of Citrus with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. *Hort. Sci.* 25 : 147-151.
- Grosser, J.W., et Gmitter F.G. Jr., 1990c. Protoplast fusion and Citrus improvement. *Plant. Breed. Rev.* 8 : 339-374.
- Grosser, J.W., Gmitter F.G. Jr., et Chandler, J.L., 1988a. Intergeneric somatic hybrid plants of Citrus sinensis cv Hamlin and Poncirus trifoliata cv Flying Dragon. *Plant. Cel. Rep.* 7 : 5-8.
- Grosser, J.W., Gmitter F.G. Jr., et Chandler, J.L., 1988b. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species : Citrus senensis and Severinia disticha. *Theo. Appl. Genet.* 75 : 397-401.
- Grosser, J.W., Moor, G.A., et Gmitter, F.G. Jr., 1989. Interspecific somatic hybrid plant from the fusion of Key lime (Citrus aurantifolia) with Valencia Sweet orange Citrus sinensis protoplast. *Scientia Hort.* 39 : 23-29.

- Grosser, J.W., Gmitter F.G.Jr., Tusa, N., et Chandler, J.L., 1990. Somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species : *Citrus reticulata* and *Citropsis gillettiana*. *Plant. Cel. Rep.* 8 : 656 : 659.
- Grosser, J.W., Gmitter F.G.Jr., Louzada. E.S., et Chandler, J.L., 1992. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parent for seedless Citrus development. *Hortscience.* 27 (10) : 1125-1127.
- Hearn, C.J., 1984. Development of seedless orange and grapefruit cultivar through seed irradiation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109 : 270-273.
- Hearn, C.J., 1986. Development of seedless orange and grapefruit cultivars through bud wood irradiation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111 : 304-306.
- Hensz, R.A., 1977. Mutation breeding and the development of the Star Ruby grapefruit. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 2 : 582-585.
- Kobayashi, S.K., Fujiwara, I., Oiyama, I., et Ishii, S., 1988. Somatic hybridization between navel orange and murcott tangor. *Proc. 6 th Int. Citrus. Cong. Middel. East.* 1 : 23-28 .
- Krug, C.A., 1943. Chromosome numbers in the subfamily aurantioideae with special reference to the genus . *Citrus. Botanical Gazette.* 104 : 602-611.
- Ohgawara, T. Kobayashi, S.K., Ohgawara, E., Uchimiya, H., et Ishii, S., 1985. Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*. *Theor.Applied. Genet.* 71: 1-4.
- Ohgawara, T. Kobayashi, S.K., Ishii, S. Yoshinoga, K. et Oiyama, I., 1989. Somatic hybridization in Citrus: Navel orange (*Citrus sinensis* obs) and grapefruit (*Citrus Paradisi* Macf). *Theor.Applied. Genet.* 78:609-612.
- Oiyama, I. ; et Okudai, N., 1983. Studies on the polyploidy breeding in Citrus. III.Occurrence of triploids in the progenies of sweet orange crossed with diploids.*Bull. Fruit. Tree. Res. Sta. Kuchinotsu.* D5:1-8.
- Ollitrault, P. 1992. Research of seedless Willow leaf mandarin by gamma ray irradiation. VII International Citrus Congress. Acireale (Italy). March : 8-13.
- Petit, P. Conia. J. Brown. S., et Bergounious, C., 1986. Cytometrie en flux et biotechnologie végétales. *biofutur.* 51
- Prévoit, C., 1985. La cytométrie de flux. *Biofutur.* 40 : 73-76.
- Russo, F. ; et Torrasi, M., 1953. Problems and objectives of Citrus genetics. 1- Selection of hybrids, nucellar embryo, and triploids and the artificial production of mutations. *Ann. Sper.Agric. Rome.* 7: 883-906.
- Schnell, F.W., 1981. Breeding methods. *Synthesis. Eucarpia. I.N.R.A. Edit.* 9-27.
- Soost, R.K. et Cameron, J.W., 1969. Tree and fruit characters of Citrus triploid from tetraploid by diploid crosses. *Hilgardia.* 39 : 569-579.
- Soost, R.K. et Cameron, J.W., 1975. Citrus. In : Janick, J. and Moore. J.N., (eds), *advances in Fruit Breeding* , purdue University Press, West Lafayette. 507-540.
- Starrantino, A. ; et Reforgiato Recupero, G. 1981. Citrus hybrids obtained in vitro from 2x females X 4x mâles. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 1 : 31-32.
- Swingle, W. T. et Reece, P.C., 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. In. Reuther, W. Webber, H.J. and Batchelor, L.D. eds. *The Citrus Industry.* 1. University of California Press. Berkeley. 190-430.
- Tachikawa, T. ; Tanaka, Y. ; et Hara, S., 1961. Investigations on the breeding of Citrus trees. I. Study on the breeding of triploid Citrus varieties. *Bul. Shizuoka. Citrus. Expt. Sta.* 4 : 33-44.

Tanaka, T., 1954. Species problem in Citrus. Jap. Soc. Prom. Sci. Ueno. Tokyo.

Tanaka, T., 1961. Citrologia : semi centennial commemoration papers on Citrus studies. Citrologia Supporting Foundation. Osaka. Japon. 114p.

Tusa, N., Grosser, J.W., et Gmitter, Jr., 1990. Plant regeneration of Valencia Sweet orange, Femminello lemon, and their interspecific somatic hybrid following protoplast fusion. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 : 1034-1046.

Tusa, N., Grosser, J.W., Gmitter, F.G.Jr., et Louzada, E.S., 1992. Production of tetraploid somatic hybrid breeding parents for use in lemon cultivar improvement. Hortscience. 27 : 445-447.