

Identification de la mandarine “Afourer” d’origine marocaine par Les isozymes comme un hybride de la mandarine Murcott honney

Handaji N¹., Cabrita²L., Ait Haddou¹ M. et Leitao² J.M.

¹ BP. 1055 INRA Kenitra Maroc (nhandaji2002@yahoo.fr)

² FERN, Université de Algarve, Campus de gambelas, 8005 Faro, Portugal

Résumé

La mandarine Afourer, d'origine marocaine, est une variété tardive très appréciée pour sa bonne qualité au niveau du marché d'exportation. Cette variété a été identifiée visuellement comme génotype différent des autres arbres nucellaires issus de semis in vivo de la mandarine Murcott honney (C. Reticulata). De ce fait, l'identification de son origine génétique apparaît déterminant pour la bonne connaissance de sa structure génétique. Les isozymes, marqueurs co-dominants et polymorphes, ont été utilisés pour répondre au dit objectif.

Pour une bonne interprétation des profils enzymatiques des variétés Afourer et Murcott honney, 12 autres variétés de mandarinier et de clémentinier ont été analysées par trois systèmes enzymatiques (IDH, PGM et PGI) qui ont révélé des polymorphismes entre les variétés au sein du même groupe de mandarinier d'une part et d'autre part entre les clones de clémentinier et les variétés de mandarinier. Cependant, les clones au sein du groupe de clémentinier ne sont pas discriminés par les isozymes. Par ailleurs, les profils polymorphiques visualisés par Afourer et Murcott honney montrent bien que la mandarine Afourer provient d'une hybridation sexuelle et écartent l'hypothèse de mutation. Une autre étude moléculaire sur la cartographie génétique de cette mandarine Afourer sera établie prochainement et financée par FIS (Fondation Internationale scientifique Suède).

Mots clé : Citrus, Mandarine, Afourer, Isozymes

ملخص

ي.بين هذا البحث اعتمادا على تقنية الملامح المتعددة الأشكال، أن صنف المندرين "أفورار" هو نتيجة لتلاقح مع صنف Murcott honny وليس لتحول تلقائي.

الكلمات المفتاحية : حوامض، مندرين، أفورار، إيسوزيم.

Abstract:

*Afourer is a Moroccan mandarin cultivar with a very good acceptance in the International market. This variety was originally identified as a dissimilar genotype among a sample of plants grown from seeds of Murcott honey mandarin (*C. reticulata*), putatively all of nucellar origin. In order to shed additional light on the origin of this variety, particularly clarifying whether it emerged via genetic recombination through sexual reproduction or via mutation of a somatic zygote, we have carried out some isozymes analyses.*

For a better interpretation of the isozyme patterns of 'Afourer' and Murcott, 12 others mandarin and clementine were also analysed. Three enzymatic systems (IDH, PGM and PGI), were studied and revealed polymorphisms between almost all mandarin varieties and similar monomorphic patterns among the clementine clones. The polymorphic patterns displayed by Afourer and Murcott honey point out the sexual origin of Afourer and discard the hypothesis of the mutation of a nucellar zygote.

Acknowledgements: this work was partially funded by the program for Scientific Cooperation CNRST (Morocco) - ICCTI (Portugal) and it will be continued by IFS support

Key words: Citrus/ mandarin/ Afourer/ Isozymes

Introduction

Le programme d'amélioration génétique des agrumes est très complexe à cause de nombreuses contraintes, tels que la pérennité de la culture, la polyembryonie nucellaire, la polyploidie, le taux élevé des mutations spontanées, la facilité d'hybridation intra et inter génique (Ollitrault et Rocca, 1992; Machado et al., 1996). Plusieurs études taxonomiques ont été réalisées sur toutes les espèces de Citrus. L'analyse de la diversité génétique (Torres et al., 1982. Roose, 1988; Ollitrault et Faure, 1992) a permis de préciser l'organisation génétique du genre Citrus. Les *C. sinensis* (Oranger), *C. aurantium* (bigaradier), *C. paradisi* (Pomelo) et *C. limon* (Citronnier) paraissent s'être diversifiés par mutations successives à partir d'un même génotype, tandis que les hybridations ont joué un rôle majeur pour *Citrus grandis* (Pamplemoussier) et *Citrus reticulata* (mandarinier). Les trois genres composant les agrumes possèdent le même nombre de chromosomes ($2n=18$), ce qui a favorisé les croisements inter génériques et interspécifiques. Cette large possibilité d'hybridation est parmi les causes de cette divergence systématique dans le genre Citrus (Barrett et Rhodes, 1976; Cottin, et al, 1997). Le groupe de mandarinier, basé sur les *Citrus reticulata*, *C. unshi* Marco vitch, *C. deliciosa* Tenore, *C. nobilis* et leurs hybrides, est le plus diversifié et le plus cultivé dans le monde après les orangers (Elisario et al., 1999).

L'étude de la variabilité des systèmes iso enzymatiques fut la première méthode efficace qui a été utilisée pour estimer la variabilité des structures génétiques dans le genre Citrus (hétérozygotie, diversité allélique) ainsi que l'organisation de la diversité (relations interspécifiques) et les mécanismes de l'évolution (reproduction sexuée et multiplication végétative) (Essen et Soost, 1977; Torres et al., 1982 ; Normand, 1988; Ollitrault, 1990; Ollitrault et Faure, 1992 et Ollitrault et al. 1995). De même, ils sont largement exploités pour trier dans une descendance, quant à l'origine zygotique ou nucellaire, les plants issus de semis de pépins polyembryonnés (Torres et al., 1978, Soost et al., 1980; Roose et Traugh, 1988, Anderson et al., 1991 et Ollitrault et Faure , 1992 et Justo et al., 1998) ou pour le contrôle des fusions somatiques (Ben Hayyin et al., 1982 et Grosser et al., 1988) ou encore pour la détermination de l'origine tissulaire des embryons régénérés (Ollitrault et al., 1992). Aussi, ils ont été utilisés soit pour l'identification des triploïdes (King et al., 1996), soit pour l'étude du mode de formation de gamètes diploïdes (Luro et al., 2000 et Handaji, 2002)

La mandarine Afourer, d'origine marocaine, a été repérée en 1982 parmi des arbres issus de semis de la mandarine Murcott honney (*Citrus reticulata* blanco) plantés en 1964 dans le cadre d'un programme de sélection nucellaire à la station expérimental d'Afourer de l'INRA Maroc. Elle a été distinguée par l'aspermie de ses fruits sous des conditions d'autopollinisation, la facilité d'épluchage, la bonne coloration de ses fruits et du jus, un excellent arôme et un goût agréable (Annexes 1, 2 et 3). En effet, la caractérisation enzymatique permet de compléter l'approche morphologique pour une identification fiable et certaine (Gogorcena et al., 1990), bien que son utilisation ne soit pas encore reconnue dans les démarches officielles de caractérisation (protection des obtentions végétales, inscription au catalogue officiel). Les isozymes, marqueurs co-dominants et polymorphes, ont été utilisés pour l'identification de la mandarine Afourer, notamment, son origine génétique et la bonne connaissance de sa structure génétique.

Cette étude faite partie du projet de coopération CNCPRST (Maroc) et ICCTI (Portugal) du 2000 et 2001 et les analyses enzymatiques ont été réalisées dans le laboratoire de génétique à l'université de Science au Portugal.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Pour une bonne interprétation des profils enzymatiques des variétés Afourer et Murcott honey, 12 autres variétés de mandarinier et de clémentinier ont été analysées par les isozymes (Tableau 1). Certains sont prélevés à partir des arbres adultes de la collection d'EL Menzeh (Maroc). Les clones Nules (K1, K2, K3 et K4) présentent des caractères morphologiques différents d'un site à un autre. La plupart de ces variétés servent comme des géniteurs dans un programme de création variétale.

Tableau1 : Liste des Clones de clémentinier et des variétés de mandarinier

Espèces et groupes	Cultivars	Origine	Code
Citrus clémentina	Nules K1	Domaine Kabbaj/Maroc	1
	Nules K2	Domaine Kabbaj/Maroc	2
	Nules K3	INRA- El Menzeh/ Maroc	3
	Nules K4	Ministère d'agriculture/Faro/Portugal	4
	Sidi Aissa	INRA- El Menzeh/ Maroc	5
	Cadoux	INRA- El Menzeh/ Maroc	6
	Ain Taoujdate	INRA- El Menzeh/ Maroc	7
Clémentine X T. Orlando Mandarine X K. of Siam Hybride naturel	Hybride Lee	INRA- El Menzeh/ Maroc	8
	Wilking Carvalhal	INRA- El Menzeh/ Maroc	9
		Ministère d'agriculture/Faro/ Portugal	14
Issus de semis de la mandarine Murcott	Afourer	INRA- El Menzeh/ Maroc	10
C. reticulata	Murcott honey	INRA- El Menzeh/ Maroc	11
	Cravo	INRA- El Menzeh/ Maroc	12
C. nobilis	King of Siam	INRA- El Menzeh/ Maroc	13

L'électrophorèse enzymatique sur gel d'amidon :

Trois systèmes iso enzymatiques ont été exploités; Isocitrate deshydrogénase (IDH), Phosphoglucose isomérase (PGI) et Phosphoglucomutase (PGM).

Généralement, le gel d'amidon est préparé la veille de l'électrophorèse. Il est constitué de : 52 g d'amidon, 25 ml de tampon tris-citrate de pH 7 et 400 ml de l'eau distillée. Ces composants sont bien homogénéisés dans un récipient placé sur un agitateur chauffant à 300°C et tournant à une vitesse environ 300 tours/min. Lorsque, le gel devient transparent, le récipient est dégazé avec une pompe à vide préalablement mise en marche. Le gel est coulé ensuite dans un moule dont les gouttières sont bouchées avec du Scotch. Après le refroidissement complet, le gel est couvert par du papier cellofrais et mis pour conservation dans un réfrigérateur.

L'utilisation des jeunes feuilles donne la possibilité de travailler à des stades précoces de développement de la plante. Environ, 200 mg de feuille par échantillon sont broyés dans un tampon d'extraction (25 ml tampon tris-HCl de pH 7.2, 0.2 M additionné de 25 mg de cysteine + 0.150 de triton X100 dilué 10 fois), additionné d'une pointe de spatule de PVPP (Polyvinilpolyrollidone) et une spatule de sable. Le broyage est effectué à 4°C dans des petits mortiers à raison d'un échantillon par mortier et avec un pilon. Ensuite, on réalise 20 à 21 encoches dans le gel à l'aide d'une petite spatule. Dans ces encoches situées à 4~5 cm du bord du gel, on applique une spatule du bleu du bromophénole qui va servir de témoin pour la migration. Par la suite, un petit rectangle de papier Wattman (1 cm x 0.5 cm) est imbibé avec l'extrait obtenu de l'échantillon et inséré dans un des encoches du gel.

La migration est réalisée en chambre froide (4°C). Les cuves d'électrophorèses sont remplies avec du tampon tris citrate pH 7 et reliées à un générateur délivrant un courant de 45 à 50 milliampères et un voltage compris entre 130 et 170 volts. Le gel, débarrassé du scotch, recouvert du papier cellofrais et d'une plaque de verre de glace, est placé dans la cuve de telle façon que les isozymes chargés négativement migrent vers l'anode. La migration est arrêtée lorsque le front de bleu a parcouru 5 cm (5 à 6 heures de migration).

Les gels d'amidon sont coupés en tranches d'un millimètre et demi (3 tranches utilisables par gel) et les tranches sont placées une dizaine de minutes à pré incuber dans le tampon de révélation du système étudié. Ce tampon utilisé est jeté, et on verse sur le gel les solutions de révélation : IDH; Isocitrate deshydrogenases, PGI; Phosphoglucose isomérases, PGM; Phosphoglucomutases. Les cuves de révélation sont ensuite placées à l'obscurité et à 37°C jusqu'à l'apparition des bandes (15 min à 1h 30 min). Les compositions des solutions mères et des solutions tampons sont présentées en annexe 4.

Les zymogrammes obtenus pour chaque hybrides représentent des profils enzymatiques. La numérotation des allèles a été faites suivant le sens de migration. Les isozymes ayant migrées le plus lentement sont notés : S, les suivants : M et le plus rapidement : F.

Resultats et discussions

L'analyse par l'électrophorèse des isozymes a permis de déterminer les profils enzymatiques de certaines variétés de mandarinier et de clémentinier (Tableau 2) et qui sont présentés selon le modèle de la figure 1.

- Le système enzymatique PGI montre deux zones de coloration : la première zone la plus lente présente une ou trois bandes et correspond à un locus PGI-1 polymorphique et à structure dimérique. La deuxième plus rapide et présente une bande monomorphique et pourrait correspondre à un locus PGI-2. Tous les clones de clémentinier présentent trois bandes ce qui montre qu'au niveau de ce locus PGI-1 sont hétérozygotes ainsi que pour les mandarines Lee, Murcott et Cravo. Tandis que les autres mandarines sont des homozygotes. Pour Torres et al. (1978), les génotypes PGI montre une certaine variabilité entre les variétés de *Citrus reticulata*.

La figure 2 (A) montre trois profil de bandes : tous les clones de clémentinier ont des profils enzymatiques identiques 'SF'. Tandis que les clones de mandarinier Lee, Murcott Honney, Cravo et Carvalhal ont le même profil enzymatique 'SM'. Alors que les clones de mandarinier Wilking, Afourer et King of Siam ont le profil enzymatique 'MM'. En effet, la mandarine Afourer présente un génotype homozygote MM différent de la mandarine Murcott hétérozygote SM. Ce qui explique bien qu'ils sont génétiquement proches en ayant en commun un allèle M.

- Le système enzymatique PGM montre quatre profils de bandes (Figures 2 B) : les clones de clémentinier et les mandarines Murcott Honney, Cravo et Carvalhal ont des profils enzymatiques identiques 'MF'. Tandis que les clones de mandarinier Lee et King of Siam ont le même profil enzymatique 'SF'. Les mandarine, Afourer et Wilking ont respectivement les profils enzymatiques 'FF' et 'SM'.

Au niveau de ce locus PGM, tous les clones de clémentiniers sont hétérozygotes et toutes variétés de mandarinier sont aussi hétérozygotes à l'exception la variété Afourer qui a un profil très distinct des autres (FF). Les profils polymorphiques visualisés par Afourer et Murcott honney montrent bien que la mandarine Afourer provient d'une hybridation sexuelle et écartent l'hypothèse de mutation. Encore, la mandarine Afourer est homozygote et Murcott hétérozygote.

- Le système enzymatique IDH montre deux profils de bandes (Figure 2 C) : tous les clones de clémentinier et la mandarine Murcott Honney ont des profils enzymatiques identiques 'SF'. Alors, ils sont hétérozygotes au niveau de ce locus. Tandis que les mandarines Lee, Afourer, Wilking, Cravo, Carvalhal et King of Siam ont le même profil enzymatique 'FF' et sont homozygotes. Les gels présentent une zone de coloration, avec un ou trois bandes. Les IDH seraient codées par un locus à structure dimérique. Aucune variabilité n'est remarquée pour les génotypes IDH au sein des mandariniers à l'exception la variété Murcott qui diffère des autres.

Les mandarines sont aisément différenciables les unes des autres avec les isozymes PGI et PGM. Cette diversité génomique est due à la variabilité génétique entre les différents constituant du groupe dont trois variétés hybrides (Lee, Wilking et Afourer), trois variétés de *Citrus reticulata* (Carvalhal, Cravo et Murcott Honney) et une autre de *Citrus nobilis* (King of Siam).

Pour les clémentiniers, la différenciation n'est pas obtenue par les isozymes car ils sont issus de mutation somatique et d'autres clones appartenant à la même espèce. Par ailleurs, les clones Nules K1, K2 K3 et K4 ont des phénotypes différents mais de profils enzymatiques identiques. En revanche, aucune confirmation ne peut être signalée pour leurs distinctions. La même conclusion a été reportée par Cabrita et al. (2001) et Ashari et al. (1989). Ils ont réalisé analysé 22 variétés d'agrumes l'aide des isozymes et ont reporté l'absence de polymorphisme entre les variétés du même espèce. Ainsi les mêmes résultats reportés par La mandarine Afouer a présenté une homozygotie pour tous les systèmes enzymatiques étudiés et elle a toujours un des allèles de la Murcott. Cette variation génétique révélée par les isozymes pourrait être liée à une autopolinisation de la Murcott, mais reste qu'une hypothèse qui serait confirmée et clarifiée dans une autre étude ultérieure

Tableau 2 : Profils enzymatiques schématisés.

Clones	PGI-J	PGM	IDH
Nules K1, Nules K2, Nules K3, Nules K4, Sidi Aissa, Cadoux, Ain Taoujdate	SF	MF	SF
Cravo, Carvalhal	SM	MF	FF
Lcc	SM	SF	FF
Wilking	MM	SF	FF
Afourer	MM	FF	FF
Murcott	SM	MF	SF
King of Siam	MM	SF	FF

F : Fast migration M : medium migration S= slow migration

Figure 1: Représentation schématique de l'analyse des zymogrammes des isozymes

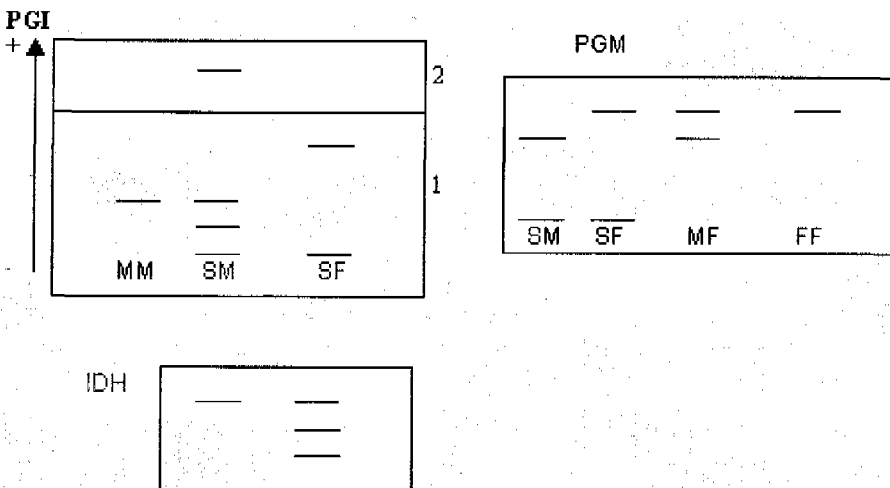
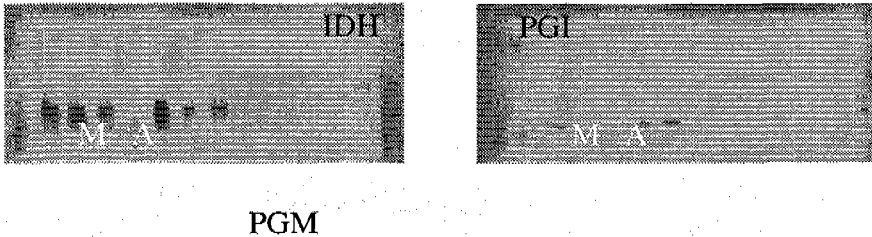


Figure 2: Zymogrammes des systèmes enzymatiques (A) PGI, (B) PGM et (C) IDH des des variétés d'agrumes; M : Murcott A : Afourer



Conclusion

L'identification variétale apparaisse déterminante pour l'origine génétique et la bonne connaissance de la structure d'espèces ainsi que des contraintes des régimes de reproductions.

L'analyse du polymorphisme de trois systèmes enzymatiques (PGI, PGM et IDH) a révélé que tous les clémentiniers étudiés sont hétérozygotes au niveau du locus PGI-1, PGM et IDH. Au niveau de locus PGI-1, les mandarines sont homozygotes à l'exception Lee, Murcott et Cravo. Et Carvalhal. Au niveau de locus IDH, les mandarines Lee, Afourer, Wilking, Cravo, Carvalhal et King of Siam sont homozygotes. Au niveau de locus PGM, toutes variétés de mandarinier sont aussi hétérozygotes à l'exception la variété Afourer qui a un profil très distinct des autres variétés étudiées (FF). Cette mandarine a présenté une homozygotie pour tous les systèmes enzymatiques étudiés et elle a toujours un des allèles de la Murcott. Par ailleurs, Les profils polymorphiques visualisés par Afourer et Murcott honney montrent bien que la mandarine Afourer provient d'une hybridation sexuelle et écartent l'hypothèse de mutation. Une autre étude moléculaire sur la cartographie génétique de cette mandarine Afourer sera établie prochainement et financée par FIS (Fondation International scientifique Suède).

Les isozymes sont plus discriminatif pour différencier entre les variétés de mandarinier et les clones de clémentinier, mais aucun polymorphisme n'a été repéré au sein de la clémentine. Par conséquent, ils ne peuvent pas servir pour des fins d'identification variétale à base génétique étroite. De ce fait, la recherche d'autres marqueurs plus précis et plus discriminants est fondamentale pour clarifier et compléter cette étude.

Références bibliographiques

- Ashari, S., Aspinall, D. and Sedgley M. 1989. Identification and investigation of relation ships of mandarin types using isozyme analysis. *Scientia Horticultural*, 40.p.305-315
- Barrett, H.C. et Rhode, A.M. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives *Syst. Bot.* N1:154-136
- Ben Hay yuin G.; Shani A; and Vardi A. 1982. Evaluation of isozyme system in citrus to facilitate identification of fusion product. *Theor. Appl. Genet.* 64:1-5
- Cabrita, L., P. Elisiaro and J. Leitao. 2001. Assesment of the genetic relation ships among citrus species and varieties by isozymes and RAPD markers. *Proc. Int. Symp. On Molecular Marker Acta Hort.* 546, 177-181
- Cottin, R. Ahlawat, V.S. Anderson, C. Aubert B., Ezzoubir D., Gmitter F., Jacquemond, C.J.P, Nadori E.B. 1997. Les Agrumes dans le monde: un annuaire du genre Citrus. SRA San Nicola 1/1997. 64p
- De Rocca Serra D, et P. Ollitrault, 1991, Amélioration des agrumes J. Ressource génétique. Journey IRFA, Montpellier 4-10 septic 1991
- Elisiaro P. J., E. M. Justo and J. M. Leitao, 1999. Identification of mandarin hybrid by isozymes and RAPD analysis. *Scientia Horticulture* 81.287-299.
- Essen A. and Soost R.K. 1977. Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo: endosperm ploidy ratio in citrus in " Congreso mundial de citricultura, 1973" Valencia, vol II, 53-63.
- Gogorcena y., Zubizycki H., and Ortiz J. M.. 1990. Identification of mandarin hybrids with the aid of isozymes from different organs. *Scientia Horticulturae*, 41 285-291.
- Grosser j. W., Gmitter F.G. and Chamdler J.L. 1988. Intergeneric somatic hybrid plants of citrus sinensis cv Hamlin and Poncirus trifoliata cv Flying dragon. *Plant Cell Reports*, 7, 5-8.
- Handaji N., P. Ollitrault,. 2002. Développement d'une méthode préferentielle de sélection des variétés triploïdes aspermes de mandariniers. Plaquette du projet PRAD (INRA Maroc et CIRAD France).
- Justo E., Elisiarro P. Jacquemond C. And Leitao J.M. 1998. Variety purity assessment of fifteen citrus rootsticks by isozymes prior to field trial implementation. *Fruit*, vol 53 P. 325-330
- King B.K., L.S. Lec and Scott P.T. 1996. Identification of triploids Citrus by isozymes analysis. *Euphytica* 90 :223-231
- Luro F., Maddy F., Ollitrault P. Et Rist D. 2000. Identification of 2n gamète parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid Citrus Hybrid. *Proceeding of Int. Soc. Of citriculture Florida - USA.*
- Machado M. A., H. D. Coletta Filho, M.L.P.N. Targon and J. Pompeu JR. 1996. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (Citrus deliciosa Tenore) using RAPD Markers. *Euphytica* 92 : 321 - 326
- Normands F. 1988. Intérêt des marqueurs enzymatiques pour l'étude des agrumes. *Fruits*, Vol. 43, n°10.
- Ollitrault P. 1990a. Isozymes and RFLP's as genetic markers in citrus selection. In *Proc. 4th Int. Asia-Pacific conf. On citrus relabatio. FAO-UNDP RAS/ 86/ 022 Proj.* 57-68.
- Ollitrault P. 1990b. A promising technic for citrus breeding and propagation. In *Proc. ISCN, 3rd congress Australia*, 10 p.
- Ollitrault P., Ollitrault F., et Cabasson C. 1992. Induction de cals embryogénèse d'agrumes par culture d'ovules. Détermination iso-enzymatique de l'origine tissulaire des embryons. Numéro spécial agrumes.

- Ollitrault P. et Faune X 1992. Citrus root Stocks characterization with bark and leaf isozymes, application to screen zygotic and nucellar trees. Abstract VII International Citrus Congress (Italy)
- Ollitrault, P., et Faure, X. 1992. Système de reproduction et organisation de la diversité génétique dans le genre Citrus. Colloque Int. Complexe d'espèces. Flux de gènes et ressources
- Ollitrault, P. et De Rocca Serra, D. 1992. L'amélioration des agrumes : II Créations variétales et Biotechnologies. Fruit. N17 : 124-134
- Ollitrault, P., Faure, X., et Luro, F. 1995. Apport du polymorphisme pour l'étude de l'organisation de la diversité génétique du genre Citrus. SRA de Corse. Symposium mandarine. 5 au 11 mars 1995
- Roose, M. I., et Traugh, S.N. 1988. Identification and performance of Citrus trees on nucellar and zygotic rootstocks. J Amer. Soc. Hort. Sci. N. 113: 100-105
- Soost H. K., William T.E. and Torres A.M. 1980. Identification of nucellar and zygotic seedling with leaf isozymes. Hortscience, 15, 728-729.
- Torres A.M., Soost H. K and Die denhofen 1978. Leaf izozymes as genetic markers in citrus. Am.J.Bot.65:869-881
- Torres A.M., Soost H.K and M.A.U Lastovicka T. 1982. Citrus isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. Journ. Heredity, 73, 335-339.