



Etude de facteurs influents sur la production de triploïdes par hybridation Entre clémentiniers et mandariniers diploïdes

*Handaji N.¹, Dambier D.², Chahbar A.¹, Arsalane N.¹,
Hmouni D.¹, Benyahia H.¹ et Ollitrault P.²*

1: PB. 257 INRA, Kenitra Maroc (nhandaji2002@yahoo.fr).

*2: CIRAD FLHOR, TA50/PS4, 34398 MONTPELLIER CEDEX 5, FRANCE
(Ollitrault@cirad.fr).*

Résumé

La triploïdie est une voie prometteuse pour la création de nouvelles variétés d'agrumes à petits fruits stériles, produisant des fruits sans pépins. Les travaux réalisés avaient spécialement pour objectif d'analyser l'influence des facteurs génotype et environnement sur la production de triploïdes à partir des croisements entre parents diploïdes.

Deux séries de croisements diploïdes ont été réalisées. La première série correspond à des croisements simples, entre le clémentinier Sidi Aissa et huit parents mâles de mandarinier (Wilking, Chienka, Carvalhal, Chuika, Satsuma Wase, Lee, Robinson et Osceola) réalisés suivant quatre expositions de l'arbre et sur trois années successives (1996, 1997 et 1998). Tandis que la deuxième série correspond à un plan de croisements diallèles réciproques, entre trois variétés (Sidi Aissa, Cravo et King of Siam) réalisés sur deux années successives (1999 et 2000). Les pépins ont été extraits des fruits mûrs et les embryons dérivés des pépins anormaux ont été mis en germination sur un milieu de Murashige et Skoog additionné de 1mg/L d'acide gibbérélique.

L'analyse par la cytométrie en flux, de 1153 plantules issues des croisements entre parents diploïdes, a permis d'identifier 111 triploïdes, 1033 diploïdes, 5 tétraploïdes et 4 haploïdes. L'analyse de variance du taux de triploïdie montre qu'il existe des différences significatives entre les combinaisons et entre les années. En revanche, il n'y a pas d'effet significatif lié à l'orientation dans l'arbre. Le pourcentage de triploïdes parmi les plantules issues des pépins anormaux de la série 1 varie en fonction des pollinisateurs. Dans cette série, la mandarine Wilking produit les taux les plus élevés (20,3%) suivie de Chuika (12,7%) et Chienka (10,4%). La clémentine Sidi Aissa utilisée comme parent femelle a montré une bonne aptitude à produire des triploïdes avec un taux moyen de 11%. Ainsi, les combinaisons (Sidi Aissa x Wilking, Sidi Aissa x Cravo et Sidi Aissa x King of Siam) ont permis l'induction spontanée de la triploïdie avec un pourcentage relativement élevé (20, 3%, 11,6% et 12,1% respectivement). Par ailleurs, la série 2 qui a utilisé trois parents femelles montre que le clémentinier sidi Aissa a une meilleure capacité à produire des triploïdes spontanés (11,8%) que Cravo (3,9%) et King of Siam (2,6%). Les conditions environnementales semblent influencer les taux de triploïdie surtout pour la série 1. L'année 1997 a été caractérisée par un taux de triploïdie élevé (20,2%). Le développement et la maîtrise de cette méthode de sélection préférentielle des triploïdes ouvre la voie à la création de populations de variétés de mandarinier à fruits sans pépins et faciles à éplucher. Les variétés sélectionnées au sein de ces populations contribueront à la diversification du verger Marocain.

Mots clés : Agrumes, mandarinier, triploïdie, sauvetage d'embryons, cytométrie en flux

ملخص

ان التضاعف الصبغي للحمضيات يعطي امكانيات كثيرة لخلق أصناف جديدة مختلفة الصيغة (ثلاثية الصبغة _ رباعية) بواسطة طرق تهجين خاصة. ان الشكل الوراثي ثلاثي الصيغة البغية ($2n = 3 = x$) الذي يهمننا في هذه الدراسة يتميز عند الحمضيات بغياب البدور, بالإضافة الى خاصيات أخرى الشكل الخارجي و الموغفولوجي والموصفات الكيماوية) تتعلق باختيار الأباء وبنجاح عملية التهجين قمنا بسلسلتين من التهجن: الأولى تتعلق بتهجين كليمانتين سيدي عسي (والد مؤنث) مع ثمانية أباء مذكورة أما السلسلة الثانية تتعلق بتهجين بين ثلاثة أنواع من الحوامض Cytométrie en flux Sidi Aissa, Cravo et King of Siam ان تقييم مستوى الصبغ الصبغية للهجن الناتجة عن تقنية (ساعد على التمييز بين الصبغة الثلاثية (111 شجيرة) وثنائي الصبغية (1033) و رباعي الصبغية (5) و أخيرا فريد الصبغية (4). انتاج الأنواع الثلاثية الصبغ تختلف حسب التركيب الجيني للأب المذكر أو الأنثي. بالنسبة للسلسلة الأولى, فان الأب المندرين (الولكين) اعطى اكبر عدد من الشجيرات الثلاثية الصبغية (20%) أما السلسلة الثانية فقد تبين أن الوالد المؤنث كلمتين سيدي عسي أعطت أحسن منتوج لثلاثية الصبغ بمعدل 11,8% .

الكلمات المفتاحية: التحسين الوراثي, حوامض, تلقيح انقاد أجنة غير ناضجة, ثلاثي الصبغة الصبغية, ستومتري دو فلي.

Abstract

Triploidy has played important role in the development of new seedless mandarin cultivars. The present work was undertaken to study effects of genotype and environmental conditions on spontaneous triploidy rates.

Two series of diploid x diploid crosses were assessed. The first is related to simple crosses between the monoembryonic female parent "clementine Sidi Aissa" and eight males mandarins parents (Wilking , Chienka , Carvalhal , Chiuka, Satsuma Wase, Lee, Robinson et Osceola) realised in three successive years (1996, 1997 and 1998) and four tree expositions (North, South, East, West). While the second dialleles and reciprocals crosses were realised between the cultivars Sidi Aissa, Cravo et king of Siam in three years (1999 et 2000). At maturity, the fruits have been harvested, and Small embryos were extracted from undevelopped seed and cultured on Murashig and Skoog medium supplemented with 1mg/L gebberilic acid. Triploid seedlings have been selected following flow cytometry analysis.

Analysis, of 1153 seedlings from diploid crosses, resulted in the identification of 111 triploids, 1033 diploids, 5 tétraploids and 4 haploids.

Variance analysis of triploidy rate showed that there is significant differences between parents combinations and between years. But, the effect of tree exposition as not significant. In the first serie using one female parent Sidi Aissa, the triploid percentage (from plantlets rescued in vitro from small seeds) varied according to parents combinations. In this serie, Wilking gave the highest number (20,3%), follwed by Chuika (12,7%) and Chienka (10,4%). While the second serie, using three females, showed that sidi Aissa has a good capacity to induce spontaneous triploidy (11,8%) in comparaison to Cravo (3,9%) and King of Siam (2,6%). In addition, year 1997 was characterized by high triploid production (20,21%) mainly because the temperature range during the flowering period was high. During this experiment, Sidi Aissa clementine used as female parent showed the highest phenologic stability and produced the highest number of triploid seedlings, for all tested combinations. This method of triploid production is promising and would allow to obtain large population of triploid hybrids with good potential for superior cultivars.

Key words : Citrus, mandarin, embryos rescue, triploidy, flow cytometry

Introduction

La qualité des fruits est un enjeu majeur pour les marchés d'exportation des petits agrumes. Elle est en particulier définie par l'absence de pépins dans les fruits. Chez les agrumes, l'aspermie repose sur la combinaison de la parthénocarpie et de deux sources principales de stérilité : la stérilité femelle ou l'absence de fécondation liée à une stérilité mâle ou à l'auto incompatibilité. Les plantes triploïdes sont connues pour présenter un fort niveau de stérilité tant pour les ovules que pour le pollen. La stérilité gamétique qui caractérise les hybrides triploïdes est expliquée par un déséquilibre chromosomique lors de la méiose (Fatta Del Bosco et al., 1992). Cet avortement méiotique offre l'avantage de supprimer les pépins des fruits. Tous les agrumes et genres apparentés ont un nombre de chromosomes de base $x=9$, avec une prédominance du niveau diploïde chez toutes les espèces cultivées et sauvages (Soost et Cameron, 1985). Il existe, cependant, de rares polyploïdes naturels comme les limes triploïdes 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). La triploidie 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 (Esen et Soost, 1971). Soost et Cameron (1975) rapportent que les triploïdes sont vigoureux, productifs et présentent des fruits sans pépins.

Plusieurs voies ont été développées à l'échelle mondiale pour obtenir des hybrides triploïdes à partir des croisements :

- La recherche des hybrides triploïdes spontanés issus de croisements entre deux parents diploïdes : Esen et Soost, (1971), Soost et Cameron (1975) et Oiyama et Okudai, (1983) ont proposé, suite à des études cytogénétiques que les hybrides triploïdes étaient issus de la fusion de gamètes femelles diploïdes et de gamètes mâles réduits. Cette hypothèse a été vérifiée par Luro et al! (2000, 2004) grâce à des études de marquage moléculaire qui ont montré que les ovules diploïdes résultent d'une restitution lors de la seconde division de la méiose (SDR). Par conséquent, le parent femelle est responsable de la détermination du taux d'apparition d'embryons triploïdes qui est lié au taux de production de mégasporos non réduits (Esen et Soost, 1977 ; Geraci et al., 1975, 1976 et 1982). La fréquence de gamètes femelles non réduits varie suivant les génotypes de moins de 1% à près de 20%. Par ailleurs, la taille des graines est très corrélée avec le niveau de ploïdie. En effet, la dimension des graines portant des embryons triploïdes est de l'ordre de 1/3 à 1/6 plus petite que celle portant des diploïdes. La petite taille des graines contenant des embryons triploïdes est due à l'arrêt précoce du développement de l'endosperme pentaploïde de la graine et constitue une caractéristique utile de présélection des triploïdes (Esen et Soost 1973 ; Geraci et al., 1975 et Oiyama et Okudai, 1983). De même, Geraci (1978) a rapporté que les embryons triploïdes issus des parents monoembryonnés et auto-incompatibles sont facile-

ment 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, limite les possibilités de générer des populations d'hybrides triploïdes. .

Les techniques de culture *in vitro* ont été utilisées pour le sauvetage des embryons triploïdes immatures issus des croisements entre les diploïdes (Starrantino, 1997). Leur combinaison avec des méthodes de cytométrie en flux a permis d'améliorer fortement la recherche des triploïdes spontanés dans les croisements entre diploïdes (Ollitrault et al., 1996a).

Croisements entre les tétraploïdes et les diploïdes : Cette voie à été la première à être exploitée systématiquement pour la création de triploïdes (Russo et Torrisi, 1953 ; Tachikawa, 1973; Esen et Soost, 1973). Cependant, le principal facteur limitant de l'exploitation complète de cette voie était la faible diversité des géniteurs tétraploïdes. Deux types de croisements ont été rapportés :

- a- Croisements entre parents femelles tétraploïdes et mâles diploïdes ($4x \times 2x$) : ainsi 85% de triploïdes et 15% de tétraploïdes ont été obtenus par Cameron et Burnett (1978) quand le parent femelle est tétraploïde et monoembryonné. En revanche, l'utilisation des parents femelles polyembryonnés rend difficile la distinction entre les nucellaires et les zygotiques triploïdes.
- b- Croisements entre parents femelles diploïdes et mâles tétraploïdes ($2x \times 4x$) : Quand le parent mâle est tétraploïde, les embryons triploïdes sont mal développés (Esen et Soost, 1972 et Esen et Soost, 1978) et le taux d'hybrides triploïdes obtenus dans les semis est généralement faible. Esen et al. (1979) ont rapporté ainsi un taux de 9%. Esen et Soost (1973a) ont montré que le rapport 3/5 (Embryon triploïde : $3x$ / Endosperme pentaploïde : $5x$) est le facteur principal de la petite taille des graines portant des embryons triploïdes. Les techniques de culture *in vitro* ont été utilisées pour le sauvetage des embryons triploïdes immatures issus des croisements entre les diploïdes et les tétraploïdes (Starrantino, 1982 ; Starrantino et Recuperò, 1982). Le principal facteur limitant l'exploitation de cette voie était la faible diversité des géniteurs tétraploïdes.

Culture *in vitro* de l'albumen (3n): Comme la plupart des Angiospermes diploïdes, les agrumes présentent des graines dont l'albumen est triploïdes (3n). Ce tissu provient de l'union des deux noyaux polaires et l'un des deux noyaux spermatiques. Gmitter et Hu (1990) ont montré que le nombre de chromosomes restait stable au cours de toute les phases de régénération de plantes à partir d'albumen. Les lignées embryogéniques qui continuaient à proliférer 18 mois après induction étaient ainsi triploïdes. Peu de travaux ont été faits dans ce domaine, car l'isolement des tissus d'albumen des tissus nucellaires est une technique très délicate (Gao et al., 1989). Par ailleurs, les plantes obtenues par cette voie étaient en majorité très peu vigoureuses (Grosser et al., com pers).

Hybridation somatique entre protoplastes diploïdes et haploïdes : Chez les agrumes, les plantes haploïdes ont pu être obtenus par androgenèse (Germana, 1992) et gynogenèse induite (Ollitrault et al., 1996b). Elles ne présentent aucun intérêt commercial, mais ouvrent la voie à la production directe d'hybrides triploïdes par hybridation somatique. La viabilité de cette approche a été démontrée par Ollitrault et al., 1998a, 1998b) qui ont obtenus une certaine d'hybrides triploïdes par électrofusion de protoplastes haploïdes et diploïdes, et par Kobayashi et al. (1997).

Plusieurs voies ont été utilisées pour produire des tétraploïdes :

- dans des semis de graines polyembryonnées, la fréquence des tétraploïdes spontanés varie de 1 à 3% (Ollitrault et De Rocca Sera, 1992). Ces autotétraploïdes 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 fécondées et les cals embryogéniques, permet l'obtention d'auto-tétraploïdes (Gmitter et Ling, 1991 et Gmitter et al., 1991). Le traitement par la colchicine combiné avec le greffage permet d'obtenir des résultats plus rapides (Grosser et Gmitter, 1990c) ;
- plus récemment la fusion des protoplastes diploïdes a permis d'élargir considérablement la diversité du pool tétraploïde par la production d'allo-tétraploïdes (Ollitrault et al, 2000; Grosser et al., 2000). Ces derniers sont hétérozygotes., très vigoureux et très productifs que les autotétraploïdes (Grosser et al., 1992 et Tusa et al., 1992).

L'INRA Maroc a engagé en 1996 un projet de diversification des petits agrumes au niveau triploïde afin d'alimenter à terme une politique de segmentation du marché des petits agrumes (Clémentine, mandarine, tangor, tangelo). La stratégie retenue est la recherche de triploïdes spontanés dans des descendances d'hybridations entre diploïdes. La mise en place de ce projet a été appuyée par un partenariat avec les équipes du CIRAD-FLHOR (France). Afin d'améliorer l'efficacité de cette stratégie, nous avons étudié l'influence des paramètres génotype et environnement sur la production de triploïdes. Le présent article est une synthèse des résultats obtenus lors de deux séries d'expérimentations.

Materiel et methodes

Pollinisation

Le choix des géniteurs a été fait sur la base des principaux critères de sélection (précocité ou tardiveté, facilité d'épluchage, calibre, teneur en jus et en sucre, productivité). Deux séries de croisement ont été effectuées (Tableau 1).

Tableau 1 : Variétés retenues comme parents géniteurs dans le programme de croisements pour la création des variétés triploïdes (El Menzeh, 1996-2000)

Série 1 : Croisements simples (1996-1998)

| | | | | | | | | |
|------|---------|---------|-----------|--------|---------|-----|----------|---------|
| ♂ | Wilking | Chienka | Carvalhal | Chuika | S. Wase | Lee | Robinson | Osceola |
| ♀ | | | | | | | | |
| S. A | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 |

(S.A. : Clémentine Sidi Aissa C1 : signifie combinaison entre Sidi Aissa et Wilking)

Série 2 : Croisements diallèles réciproques (1999-2000)

| | | | | |
|--------------|---|------------|-------|--------------|
| Parents : | ♂ | Sidi Aissa | Cravo | King of Siam |
| ♀ | | | | |
| Sidi Aissa | | | C9 | C10 |
| Cravo | | C11 | | C12 |
| King of Siam | | C13 | C14 | |

La première série correspond à des croisements simples entre huit parents mâles et un parent femelle monoembryonné et auto-incompatible (Tableau 1). Les huit mandariniers utilisés sont Chienka, Chuika, Osceola, Robinson, Wilking, Lee, Satsuma Wase et Carvalhal. Le parent femelle est représenté par Sidi Aissa (premier clone du verger marocain de clémentinier). Pour chaque croisement, une moyenne de 60 fleurs par arbre et par exposition de l'arbre et sur deux arbres adjacents, ont été pollinisées par le même parent mâle durant le mois de Mars et Avril 1996, 1997 et 1998.

La deuxième série correspond à un plan de croisements diallèles réciproques entre deux variétés de mandarinier polyembryonnées et auto-compatibles (Cravo, semi précoce et King of Siam, tardive) et la clémentine Sidi Aissa. Pour chaque croisement, après castration du parent femelle auto-compatible, 40 fleurs par arbre sur deux arbres adjacents, ont été pollinisées par le même parent mâle durant les mois de Mars et Avril 1999 et 2000.

Les travaux sont menés suivant une série d'étapes successives qui débutent par la pollinisation contrôlée en verger des parents pour aboutir à la caractérisation précoce des hybrides diploïdes et triploïdes. Les essais ont été répétés pendant trois années successives pour la série 1 et deux années successives pour la série 2 et ce afin de conforter les résultats et déterminer les effets environnementaux.

Germination des embryons in vitro

Toutes les graines sont extraites des fruits mûrs et classées en deux catégories selon leur morphologie : normales (graines entièrement développées) et anormales (graines partiellement développées, de forme plate ou petite).

Sous la hotte à flux laminaire, les graines anormales (plates ou petites) ont été placées dans des boules à thé et désinfectées, pendant 10 min, dans une solution de mercryl Lauryl puis dans l'alcool à 70° et l'eau de javel à 4%. Ensuite, elles ont été lavées trois fois dans l'eau distillée stérile. La décortication des graines a été faite très délicatement pour éviter d'abîmer les embryons. Le milieu de germination est composé de macro et micro-éléments de Murashige et Skoog (1962) additionné de 1mg/L^{-1} d'acide gibbérellique. L'autoclavage a lieu à 120°C pendant 20 minutes. Chaque embryon a ensuite été mis dans un tube à essai contenant le milieu de culture. Les cultures ont été incubées sous une lumière de 2000 lux, assurée par des tubes à néon, une photopériode de 16 heures et une température de $27\pm 1^\circ\text{C}$ pendant le jour et $19\pm 1^\circ\text{C}$ la nuit.

Acclimatation

Deux à trois mois après la germination, les vitroplants enracinés sont passés par une phase d'endurcissement pour les préparer à l'acclimatation. L'endurcissement consiste à fermer les tubes à essais par du coton après avoir nettoyé les racines du milieu de culture. Cette étape dure une trentaine d'heure à température ambiante. Chaque plantule est ensuite repiquée dans un pot contenant un mélange du sable stérile et du substrat, puis placée sous serre dans des conditions de température de 27°C et d'humidité de 80%. Les pots ont été recouverts par un parafilm pendant 3 semaines à un mois, afin de maintenir une forte hygrométrie autour des jeunes plantules. La suppression progressive du film plastique évite les à-coups de végétation. A noter que le passage de la jeune plantule du milieu in vitro à la terre est délicat et la croissance est lente durant les premiers mois. Les plantules obtenues sont ensuite analysées par la cytométrie en flux et greffées sur les porte-greffes d'agrumes (bigaradier et Citrange troyer) pour réaliser ensuite les essais de comportement.

Analyse de niveau de ploïdie par la cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de mesurer la quantité de l'ADN. Cette quantité est déterminée, d'une part par sa position dans le cycle cellulaire et, d'autre part, par le nombre de copies du génome par noyau (niveau de ploïdie). Lorsqu'un témoin interne de ploïdie connu est intégré à l'analyse, permet de déterminer le niveau de ploïdie des échantillons. Les plantules issues de sauvetage d'embryons sont analysées par le cytomètre en flux. Le protocole de cette technique est celui utilisé par Ollitrault et al. (1995). Les étapes d'analyse sont décrites ci dessous.

- **Extraction des noyaux :** Environ 100 mg (1 cm² de feuilles) d'échantillon sont placés dans une boîte de pétri contenant 0.5 ml de tampon de PBS (de 7.65g/L Chlorure de sodium, 0.724g/L de Phosphate disodique, 0.21gL⁻¹ de Phosphate monosodique et à pH 7,2) auquel on ajoute du Dithiothréitol DTT (1mg/ml du tampon PBS), du Triton X-100 (0,3 mL/100ml de tampon PBS). L'échantillon est coupé finement et rapidement avec une lame de rasoir. La suspension obtenue est filtrée à 48 µm sur des tamis montés individuellement sur des tubes.

L'introduction d'un surfactant (triton) réduit l'adhésion des débris cellulaires, disperse la chlorophylle non désirée, et minimise les fixations non spécifiques des fluorochromes lipophiles. Les anti-oxydants (DTT) diminuent le brunissement de la préparation.

- **Coloration des noyaux :** Le colorant (fluorochrome) rajouté dans l'échantillon filtré volume à volume avec une solution d'iodure de propidium (0.2 mg/mL), est agité quelques secondes au vortex avant d'être incubé 10 min à température ambiante. L'iodure de propidium, colorant spécifique aux acides nucléiques, émet une fluorescence rouge sous ultraviolet (Absorption maximale à 370-550 "nm et émission maximale à 620"nm).
- **Calibrage :** Une gamme d'étalonnage doit en théorie encadrer strictement tout échantillon à analyser. Les noyaux en suspension cellulaires ne sont analysés qu'après étalonnage de l'appareil par des témoins diploïdes, triploïdes et/ou tétraploïdes.
- **Cytométrie :** Les mesures de l'intensité de fluorescence, correspondant à des quantités d'ADN, sont exprimées en unités arbitraires. Pour prendre une signification, ces valeurs doivent être comparées à des valeurs repères (au niveau de ploïdie par exemple) définies à l'aide d'un témoin (Figure 1). Les témoins, utilisés dans ce travail sont des triploïdes (la lime Tahiti), des diploïdes (mandarine commun) et des tétraploïdes (porte-greffe allotétraploïdes issus de fusion somatique). Les plantules issues de la première série des croisements (1996-1999) ont été analysées par le cytomètre en flux de type EPICS XL (COULTRONICS) au niveau d'un laboratoire d'analyse médicale à Rabat. Tandis que celles issues de la deuxième série ont été analysées par le cytomètre en flux de type FASCAN au niveau de CIRAD FLHOR.

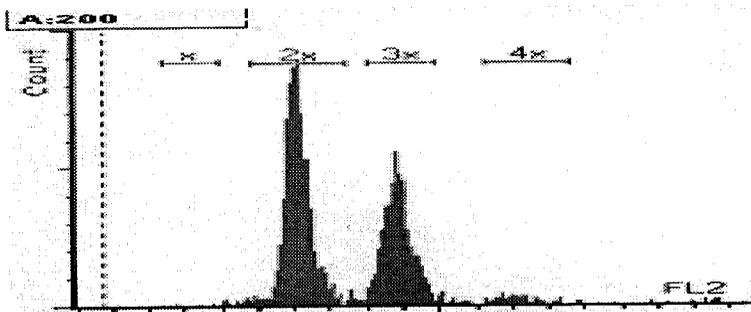


Figure 1 : Modèle général des histogrammes obtenus après analyses par la cytométrie en flux des hybrides de mandarinier selon leurs niveaux de ploïdie

Resultats et discussion

Le nombre de petits pépins par fruit et le pourcentage de petits pépins diffèrent significativement suivant les croisements (Tableau 2a). Pour la série 1, les meilleurs résultats sont obtenus avec le pollinisateur Chienka tandis que pour la Série 2 les combinaisons Sidi Aissa x pollinisateurs Cravo et Cravo x King of Siam produisent les meilleurs pourcentages de petits pépins.

Tableau 2a : Nombre moyen de pépins par fruit selon les 14 combinaisons parentales

| Combinaisons | Parent mâle | Parent femelle | Nombre de fruits obtenus | Nombre de pépins obtenus | | | pépins anormaux (%) | |
|----------------|--------------|----------------|--------------------------|--------------------------|---------|----------|---------------------|-------------------|
| | | | | Total | Normaux | Anormaux | | |
| Série 1 | | | | | | | | |
| C1 | Sidi Aissa | Wilking | 259 | 4985 | 4409 | 576 | 2,22 | 11,5 ^b |
| C2 | Sidi Aissa | Chienka | 163 | 1211 | 824 | 387 | 2,37 | 31,9 ^a |
| C3 | Sidi Aissa | Carvalho | 111 | 1791 | 1681 | 110 | 0,99 | 6,1 ^c |
| C4 | Sidi Aissa | Chuika | 110 | 1127 | 1011 | 116 | 1,05 | 10,2 ^b |
| C5 | Sidi Aissa | S. Wase | 78 | 569 | 505 | 64 | 0,82 | 11,2 ^b |
| C6 | Sidi Aissa | Lee | 115 | 1570 | 1402 | 168 | 1,46 | 10,7 ^b |
| C7 | Sidi Aissa | Robinson | 188 | 1945 | 1685 | 260 | 1,38 | 13,3 ^b |
| C8 | Sidi Aissa | Osceola | 136 | 1763 | 1626 | 137 | 1,00 | 7,7 ^c |
| SERIE 2 | | | | | | | | |
| C9 | SIDI AISSA | CRAVO | 144 | 977 | 737 | 240 | 1,66 | 24,5 ^d |
| C10 | SIDI AISSA | KING OF SIAM | 93 | 1876 | 1692 | 184 | 1,97 | 9,8 ^e |
| C11 | CRAVO | SIDI AISSA | 25 | 422 | 376 | 46 | 1,84 | 10,9 ^e |
| C12 | CRAVO | KG OF SIAM | 17 | 120 | 93 | 27 | 1,58 | 22,5 ^d |
| C13 | KING OF SIAM | SIDI AISSA | 25 | 181 | 159 | 22 | 0,88 | 12,1 ^e |
| C14 | KING OF SIAM | CRAVO | 20 | 166 | 146 | 20 | 1,00 | 12,0 ^e |
| TOTAL | | | 1484 | 18703 | 16346 | 2357 | 1,58 | 12,6 |

Les valeurs suivies des mêmes lettres ne diffèrent pas significativement à 5%.

Tableau 2b: Ploïdie des plantules issues de la germination des embryons extraits des pépins anormaux

| Combinaison | Parent _ | Parent _ | Nombre d'embryons mis en germination | Nombre de plantules analysées | | |
|----------------------|------------------|------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------|------------|
| | | | | Total | Diploïdes | Triploïde: |
| Série 1 | | | | | | |
| C1 | Sidi Aissa | Wilking | 1509 | 162 | 126 | 33 |
| C2 | Sidi Aissa | Chienka | 1161 | 86 | 76 | 9 |
| C3 | Sidi Aissa | Carvalho | 330 | 52 | 51 | 1 |
| C4 | Sidi Aissa | Chuika | 347 | 55 | 48 | 7 |
| C5 | Sidi Aissa | S. Wase | 191 | 45 | 42 | 3 |
| C6 | Sidi Aissa | Lee | 506 | 47 | 44 | 3 |
| C7 | Sidi Aissa | Robinson | 778 | 66 | 62 | 4 |
| C8 | Sidi Aissa | Osceola | 412 | 87 | 78 | 8 |
| Total Série 1 | <i>Un parent</i> | <i>8 Parent</i> | <i>5234</i> | <i>600</i> | <i>527</i> | <i>68</i> |
| Série 2 | | | | | | |
| C9 | Sidi Aissa | Cravo | 481 | 146 | 129 | 17 |
| C10 | Sidi Aissa | King of Siam | 368 | 140 | 119 | 17 |
| C11 | Cravo | Sidi Aissa | 93 | 24 | 24 | 0 |
| C12 | Cravo | Kg of Siam | 155 | 128 | 22 | 6 |
| C13 | King of Siam | Sidi Aissa | 44 | 15 | 14 | 1 |
| C14 | King of Siam | Cravo | 141 | 100 | 8 | 2 |
| Total Série 2 | <i>3 parents</i> | <i>3 Parent</i> | <i>1282</i> | <i>553</i> | <i>682</i> | <i>43</i> |
| Totaux | 3 parents | 11 Parent | 6516 | 1153 | 1033 | 111 |

Les valeurs, suivies des mêmes lettres, ne diffèrent pas significativement à 5%

CMF : la cytométrie en flux _ : Parent femelle _ : Parent mâle

(¹) : Taux de triploïdie = Nombre de plantules triploïdes/Nombre total des plantules analysées

(²) : Moyenne de taux de ploïdie par série.

Un total de 1153 plantules hybrides, issues des croisements diploïdes effectués de 1996 à 2000, ont été analysés par cytométrie en flux (Tableau 2b). Quatre niveaux de ploïdie ont été identifiés: 111 hybrides triploïdes, 1033 diploïdes, 5 tétraploïdes et 4 haploïdes. Les hybrides triploïdes ont tous été obtenus à partir de pépins partiellement développés ce qui confirme les résultats obtenus par Esen et Soost (1971) ; Gerarci et al. (1982) ; Starrantino (1995) et Oiyama et Okudai (1983) qui ont trouvé que l'arrêt précoce du développement de l'endosperme pentaploïde est responsable de la formation de graines de petite taille et ce dernier caractère permet une sélection précoce des triploïdes. Le taux de triploïdie, rapporté aux pépins anormaux, a été de 11,33% pour la série 1 et de 9,6% pour la série 2 (Tableau 3). L'analyse de la variance du taux de triploïdie, dans le cas de la série 1, montre la présence de différence hautement significative entre les huit combinaisons parentales et entre les trois années (Tableau 3). Dans le cas de la série 2, seule une différence significative a été notée entre les six combinaisons parentales (Tableau 4). Aucune interaction n'a été enregistrée entre les paramètres étudiés pour les deux séries.

Tableau 3 : Pourcentages de triploïdes, d'haploïdes, de tétraploïdes et de diploïdes selon les séries de croisements entre les parents diploïdes (1996 – 2000)

| | Total | Triploïdes | Diploïdes | Tétraploïdes | Haploïdes |
|---|-------|-------------------|-----------|--------------|-----------|
| Nombre de plantules (Série 1) ¹ | 600 | 68 | 527 | 5 | 0 |
| Pourcentage | 100 | 11,3 | 87,9 | 0,8 | 0 |
| Nombre de plantules (Série 2) ¹ | 553 | 43 | 506 | 0 | 4 |
| Pourcentage | 100 | 7,7 | 91,5 | 0 | 1,1 |
| Nombre total de plantules | 1153 | 111 | 1033 | 5 | 4 |
| Pourcentage | 100 | 9,6 | 89,5 | 0,4 | 0,3 |

¹: Nombre de plantules issues de la germination in vitro des pépins anormaux analysées par la cytométrie en flux

Taux de triploïdie (TT) = Nombre de plantules triploïdes/ Nombre total des plantules analysées

Tableau 4 : Résultats d'analyse de la variance du taux de triploïdie pour chaque série de croisements

| | DI | CM | F | Probabilité |
|-----------------|----|------|------|--------------------|
| Série 1 | | | | |
| Combinaison (C) | 7 | 5.91 | 4.03 | 0.0066 (HS) |
| Exposition (E) | 3 | 3.89 | 2.65 | 0.0765 (NS) |
| Année (A) | 2 | 9.94 | 6.78 | 0.0057 (HS) |
| C X E | 21 | 2.38 | 1.63 | 0.1425 (NS) |
| C X A | 14 | 2.91 | 1.98 | 0.0814 (NS) |
| E X A | 6 | 0.65 | 1.81 | 0.1481 (NS) |
| Erreur | 20 | 1.46 | | |
| Série 2 | | | | |
| Combinaison (C) | 5 | 0,01 | 8,35 | 0,018 (S) |
| Année (A) | 1 | 7 | 3,22 | 0,6 (NS) |
| C X A | 5 | 0,06 | 4,23 | 0,5 (NS) |
| | | 0,01 | | |
| | | 5 | | |

dl : degré de liberté SCM : Somme des carrés moyens M.C : Carrées moyens

F : Fréquence à 0.05 Pr : Probabilité NS : non significatif HS : hautement significatif S : significative

Effet de génotypes parentaux

Le taux de triploïdie varie de 6 à 20,3% selon les combinaisons. La combinaison C1 (Sidi Aïssa x Wilking) a donné le meilleur taux de triploïdie (Tableau 2b). La mandarine Wilking se caractérise par un pouvoir de pollinisation très élevé ce qui est susceptible d'augmenter la probabilité de féconder les ovules non réduits. Cette variété peut être considérée comme le pollinisateur le plus efficace de la clémentine Sidi Aïssa dans un programme de création des variétés aspermes triploïdes. En revanche, elle n'a aucun intérêt commercial en raison de la grande pépiniisation de ses fruits. Sa suppression des vergers par arrachage ou par surgreffage a été ainsi largement recommandée au Maroc. Viennent ensuite les combinaisons C4 (Sidi Aïssa x Chuika) avec un taux de triploïdie de 12,7%. Les combinaisons C5 (Sidi Aïssa x S. Wase) et C8 (Sidi Aïssa x Osceola) ont donné, quand à elles, un nombre moyen de plants triploïdes. Par contre C3 (Sidi Aïssa x Carvalhal) a produit un très faible taux de triploïdes (1,9%).

Par ailleurs, la deuxième série de croisements diallèles a été caractérisée par des taux de triploïdie variant de 0 à 12,1% selon les six combinaisons parentales (Tableau 2b). La clémentine Sidi Aïssa monoembryonnée, prise comme femelle, a induit le meilleur taux moyen de triploïdie spontanée (11,8%) par rapport aux autres mandarines polyembryonnées. Cravo (3,9%) et King of Siam (2,6%) (Figure 2). Au cours des deux séries de croisements, la clémentine Sidi Aïssa, prise comme parent femelle, s'est caractérisée par une bonne aptitude à produire des triploïdes spontanés avec des taux de 11,33% (série 1) et de 7,7% (série 2). Elle a, par ailleurs, permis un bon déroulement de toutes les étapes de la pollinisation et de la sélection zygotique grâce à son auto-incompatibilité et sa monoembryonie. En revanche, le choix de Sidi Aïssa, comme parent mâle, n'a pas permis l'induction de la triploïdie spontanée. Les mandarines Cravo et King of Siam, choisies comme parents femelles, ont produit de très faibles pourcentages de triploïdes. Elles sont auto-compatibles et polyembryonnées, ce qui nécessite une castration manuelle avant la pratique de la pollinisation. Par conséquent, les premiers critères de choix des parents femelles seraient la mo-

noembryonie, l'auto-incompatibilité et l'aptitude à produire des triploïdes spontanés. Par ailleurs, le choix de parents mâles doit être basé sur les critères de sélection relatifs à la qualité des fruits et à la productivité et la capacité de pépinisation. Ces croisements diploïdes ont permis l'induction de la tétraploïdie par les combinaisons C1, C2 et C8 et de l'haploïdie par la combinaison C10.

Oiyama et Kobayashi (1991) ont obtenu pour le même parent femelle un taux de triploïdie variant de 25 à 40%, respectivement, pour les parents mâles *Poncirus trifoliata* et le bigaradier Kawano Natsudaïdai. Aussi, Oiyama et Kobayashi (1990) ont montré que la clémentine permet l'augmentation de taux de triploïdie. En revanche, Esen et Soost (1972) ont montré que le taux de triploïdie reste constant dans les croisements diploïdes où le même parent femelle est pollinisé par plusieurs parents mâles. Ils ont expliqué ce phénomène par la stabilité du pourcentage de production des gamètes femelles non réduits. En outre, Gerarci et al. (1975, 1976 et 1982) ont rapporté que le parent femelle est responsable de la détermination du taux d'induction spontanée de la triploïdie qui, selon Esen et Soost (1971), peut être supérieur à 5%. Il est lié aux taux de la production de mégaspoires non réduits qui peut varier de 1 à 20% (Iwamasa et al., 1988).

Effet de l'année

Les taux de triploïdie ont varié significativement en fonction des années pour la première série de croisement (Figure 3). Pour la série 2, l'effet n'était pas significatif pour le taux de triploïdie. Mais, les rendements en hybrides triploïdes ont été meilleurs en 2000 qu'en 1999 (35 triploïdes contre 8 en 1999). L'étude des données météorologiques montre que les deux années présentant les meilleurs taux de triploïdes (1997 et 2000) se caractérisent, durant la période de l'induction florale, par des températures minimales faibles et des maxima élevés. Cette variation d'amplitude thermique pourrait être responsable de la formation de gamètes femelles non réduits. De plus, cette période n'était pas pluvieuse ce qui a favorisé un bon déroulement de la pollinisation par rapport aux autres années. Plusieurs auteurs (Esen et Soost, 1972 ; Barret, 1990 ; Oiyama et Kobayashi, 1991 ; Fatta del bosco et al., 1992) ont montré que les températures élevées ou anormalement basses peuvent provoquer la formation des polyploïdes. L'action directe et significative des facteurs climatiques (température, photopériode et pluviométrie) sur différents processus d'induction florale a été largement étudiée. Toutefois, il n'est pas possible de contrôler ces facteurs pour des arbres en verger. Le choix des génotypes parentaux reste donc le principal facteur sur lequel le sélectionneur peut intervenir pour améliorer le taux de triploïdes.

Effet de l'orientation sur l'arbre

Il n'existe pas de différence significative entre les quatre expositions de l'arbre, malgré l'obtention d'un taux élevé de 41% dans l'exposition Nord contre, 25 %, 17% et 17%, respectivement, dans les expositions Sud, Est et Ouest (Tableau 5). La grande variabilité entre années pourrait masquer un tel effet. Les combinaisons, C1, C2 et C4 ont donné des plants triploïdes dans les quatre expositions de l'arbre. Lemée (1978) a montré que l'exposition de l'arbre influait surtout sur la photopériode, l'angle d'incidence des rayons solaires et la surface foliaire (intensité de photosynthèse). De ce fait, l'exposition de l'arbre pourrait avoir un effet direct sur l'induction florale et le taux de fécondation. Mais, ceci devrait être confirmé dans une autre étude ultérieure.

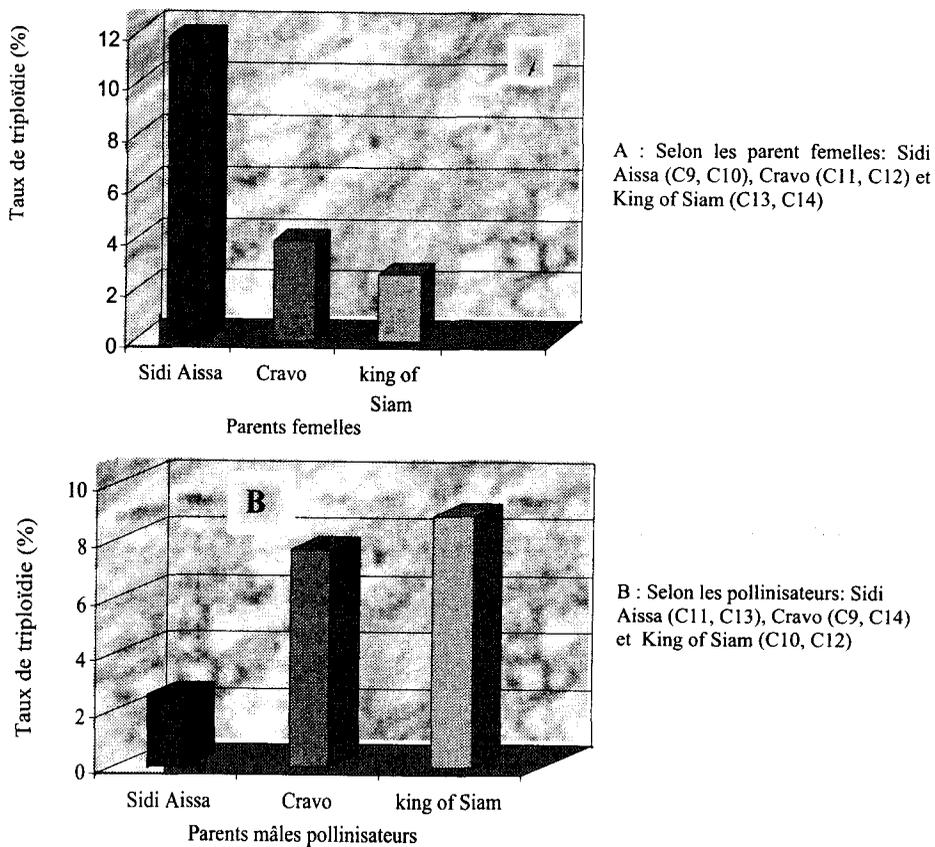


Figure 2 : Taux moyen de triploïdie à partir des croisements diallèles et réciproques entre les parents diploïdes (série2: 1999-2000)

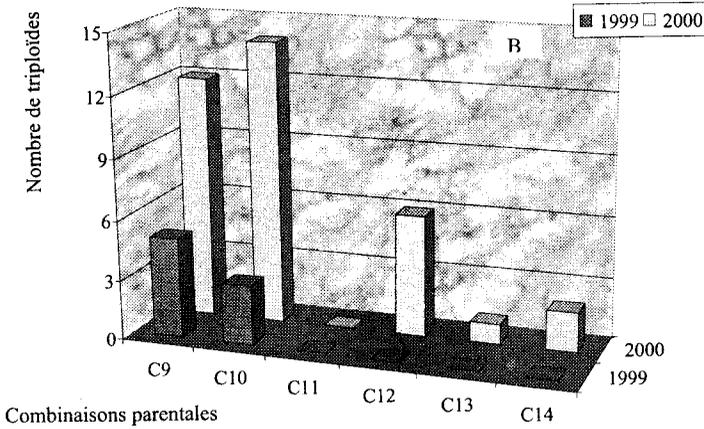
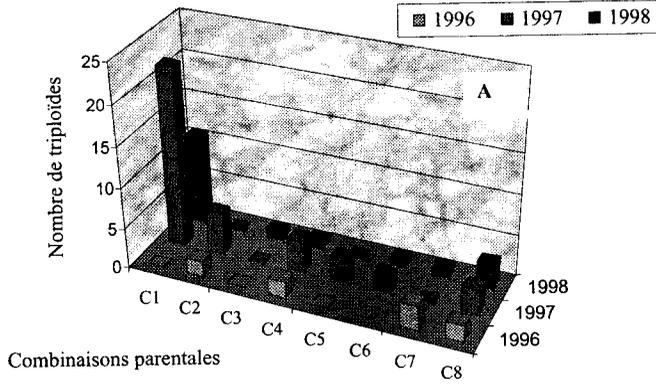


Figure 3 : Effectif d'hybrides triploïdes obtenus durant la série 1 (1996-1998) (A) et la série 2 (1999- 2000) (B)

Tableau 5 : Nombre de plants triploïdes par exposition de l'arbre et par année de croisements (Série 1, 1996-1998)

| | Est | Nord | Ouest | Sud | Total |
|-------|-----|------|-------|-----|-------|
| 1996 | 4 | 0 | 2 | 1 | 7 |
| 1997 | 4 | 20 | 5 | 9 | 38 |
| 1998 | 4 | 8 | 5 | 6 | 23 |
| Total | 12 | 28 | 12 | 16 | 68 |

Conclusion et perspectives

La synthèse des résultats des deux séries de croisements entre diploïdes a permis de montrer que la variation du taux de triploïdie dépend de la combinaison des deux parents mâle et femelle. Le choix raisonné des géniteurs en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et de leurs aptitudes à produire des triploïdes permettra d'obtenir des populations d'hybrides triploïdes très diversifiés par l'époque de production ainsi que par les qualités organoleptiques et pomologiques. L'étude de l'effet du génotype permet d'orienter d'ores et déjà le choix du géniteur femelle ou des combinaisons de parents pour améliorer le taux de triploïdie. Ainsi, la clémentine Sidi Aissa qui se caractérise par sa monoembryonie et son auto incompatibilité a montré une bonne aptitude à produire des triploïdes. Celle-ci atteint le taux de 11% parmi les plantules issues de pépins anormaux. Par ailleurs, les combinaisons Sidi Aissa x Wilking, Sidi Aissa x Cravo et Sidi Aissa x King of Siam ont permis d'obtenir des taux relativement élevés de triploïdes.

L'analyse par la cytométrie en flux de 1153 plantules issues de croisements entre parents diploïdes a permis d'identifier 111 triploïdes, 1033 diploïdes, 5 tétraploïdes et 4 haploïdes. Cette technique ouvre des perspectives prometteuses pour l'amélioration génétique des agrumes, principalement pour l'évaluation de niveau de ploïdie dans le cadre de programmes d'amélioration s'appuyant sur la manipulation de la ploïdie. Elle constitue ainsi un marqueur rapide des doublements chromosomiques spontanés, de la non réduction des gamètes et de l'haplogénèse. La facilité et la rapidité de sa mise en œuvre sont des atouts déterminants pour la sélection de cultivars triploïdes. Le développement et la maîtrise de cette méthode de sélection ouvrent ainsi la voie à la création de vastes populations d'hybrides de mandarinier, à fruits de gros calibre, sans pépins et faciles à éplucher.

Les hybrides triploïdes déjà créés ont été multipliés et sont en phase d'évaluation qualitative dans la station d'El Menzeh. Les meilleurs hybrides, sur le plan qualitatif, feront ensuite l'objet d'essais variétaux multi locaux pour préciser leurs comportements agronomiques. Les meilleurs clones triploïdes aspermes de mandariniers devront passer par les étapes suivantes :

- la description selon le descripteur 'UPOV' en vue de les inscrire au catalogue officiel ;
- le contrôle sanitaire des clones élites en vue de la diffusion du matériel végétal de qualité.

L'INRA prendra en charge l'étape fondamentale de maintien du matériel de départ et de pré-base et assurera les multiplications de base et de greffons de manière à fournir ce matériel végétal en quantité suffisante aux pépiniéristes agréés. Ces derniers auront pour tâche la multiplication végétative à grande échelle selon la réglementation en vigueur.

Remerciements

Cette étude a été financée par le projet PRAD (coopération Maroc-France), les conventions nationales (SODEA, D. Kabbaj) et le marché DPV (Ministère d'agriculture, Maroc). Les auteurs marocains tiennent à remercier l'équipe de laboratoire d'Amélioration des plantes du CIRAD FLHOR Montpellier, de l'INRA Corse France et aussi Messieurs : Dr Allali Mohamed (Directeur du Centre technique, ORMVAG/ Kenitra) et Dr Abousalim A. (Professeur à l'IAV Hassan II, Rabat) pour toutes les corrections apportées à ce document.

Références bibliographiques

- Barrett, H.C. 1974. Colchicine induced polyploidy in Citrus. *Bot. Gaz.* N. 135: 29-41
- Barrett, H.C. 1990. US 119, an intergeneric hybrid citrus scion breeding line. *Hort Science*. N25: 1670-1671.
- Cameron J.W. et Frost H.B. 1968. Genetics, breeding and nucellar embryony. In Rentehr, W. Webber, H.J. and Batchelor, L. D. eds. *The citrus Industry*. 2. University of California Press. Berkeley.
- Cameron J.W. et Burnett, R.H. 1978. Use of sexual tetraploid seed parents for triploid citrus hybrid. *Hort. Sci.*, vol 13. N2:167-169.
- Esen, A. et Soost. R.K. 1977. Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophyte and embryo: endosperm ploidy ratio in citrus. In: *Iero congresso de Citricultura*. 1973 Valencia , Vol II: 53 - 63.
- Esen A. et Soost. R.K. 1971. Unexpected triploid in Citrus. Their origin, identification and possible use. *The journal of Heredity*. N 62: 329-333
- Esen A. et Soost. R.K. 1972a. Aneuploidy in Citrus. *Amer. J.Bot.* N. 59:473-477.
- Esen A. et Soost. R.K. 1972b. Tetraploid progenies from 20x4x crosses of Citrus and their origin. *J. Amer. Soc Hort. Sci.* vol 97, N3:410-414.
- Esen, A. et Soost. R.K. 1973a. Precocious developpement and germination of spontaneous triploids seeds in Citrus. *J. Heredity*. N 64: 147- 154
- Esen, A. et Soost. R.K. 1973b. Seed developpement in Citrus with special reference to 2x4x crosses. *Amer. J.Bot.* N. 60:448-462
- Esen, A., Soost. R.K. et Gerarci, G. 1978. Seed set, size, and developpement after 4x4x and 4x8x crosses in Citrus. *Euphytica* N. : 283-294.
- Fatta Del Bosco, S. ; Matrange, G. et Gerarci G. 1992. Micro and macro sporogenesis of two triploids hybrids of citrus. *Proc. Inter. Soc. Citriculture*. 122-124.
- Gao, F. Shang, F. R., Wu, AR et Chen, S. 1989. Production of triploid plantelets by in vitro culture of citrus embryos. *Hereditas* being. N.10: 6-11
- Gerarci, G. 1978. Percentage of triploid offspring of cross pollinated diploid polyembryonic Citrus. *Proc. Inter. Soc. Citriculture* 57-58.
- Gerarci, G. Esen, A. et Soost. R.K. 1975. Triploid progenies from 2x4x crosses of Citrus cultivar. *The journal of Heredity* N. 66: 177-178.
- Gerarci, G.; De Pasquale, F. et Tusa, N. 1976. Incidenza della triploida su alcune cultivar diploidi di mandarinie limoni. *Riv Ortofrutt. Italiana*. N.60 :127-131.
- Gerarci, G., Starrantino, A., Reforgiato Recupero, G et Russo, F. 1982. Sontaneous triploidy in progenies of monoembryonic hybrids of clementine commune X king of Siam. *Genetic Agr* N.36: 113-118.
- Germana, M. A. (1992). Androgenesis in Citrus: a review. *Proc. Int Soc. Citric.* 1, 183-189.
- Gmitter, F.G. Jr, et Ling X. 1991. Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped Citrus ovules treated with colchicines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* N.116:317-321
- Gmitter, F.G. Jr, et Hu X. 1990. The possible role of yunna China in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae). *Econ. Bot.* N. 44: 267-277
- Gmitter, F.G. Jr, Ling X., Cai, et Grosser, J.W. 1991. Colchicine induced polyploidy in Citrus embryogenesis cultures, somatic embryos and regenerated plantlets. *Plant. Sci.* N.74 : 135-141.
- Grosser, J.W. et Gmitter, F.G. 1990a. Somatic hybridization of Citrus with wild relatives for germplasm enhancement and cultivar development. *Hort. Sci.* N 25: 147-151.
- Grosser, J.W. et Gmitter F. G. Jr. 1990b. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breed. Rev.* N8: 339-374.
- Grosser, J.W., Gmitter F. G. Jr., Louzada E. S, et Chandler, J.L. 1992a. Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parent for seedless Citrus development. *Hort Sci.* vol 27 N.10:1125-1127.
- Grosser, J. W., Ollitrault, P., and Olivares, O. 2000. Somatic hybridization in Citrus : an effective tool to facilitate variety improvement. *In vitro Cell Dev. Biol -Plant* N.36, 434-449.
- Iwamasa, M., Nito, N. et Ling J. T. 1988. Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily, Aurantioideae. In *Proc. Citrus. Congress*. 123- 130.
- Kayim, K., Kemalkoc, N., et Rokka, V. M. 1998. Variation of the nuclear DNA content of species of subtribe Citrinae (Rutaceae). *Hort. Scie.* Vol 33. N.7: 1247 - 1250.
- Kobayashi, S.K. Fujiwara, I. Oiyama, I. et Ishii S. 1988. Somatic hybridation between Navel orange and Murcott tangor. *Proc. 6th Int. Citrus Cong. Middel. East* 1 23-28

- Kobayashi, S., Ohgawara, T., Saito, W., Nakamura, Y., and Omura, M. (1997). Production of triploid somatic hybrids in Citrus. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* N.66, 453-458.
- Krug, C. A., 1943. Chromosome numbers in the subfamily aurantiodeae with special reference to the genus Citrus. *Botanical Gazette*. 104: 602-611.
- Limée, G. 1978. *Précis d'écologie végétal*. Edition Masson. 278 p.
- Luro F., Maddy F., Ollitrault P. and Rist D. 2000. Identification of 2n gamète parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid Citrus Hybrid. *Proceedin of Int. Soc. Of citriculture*.
- 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 (Vol.2): 841-847.
- Murashige, T., et Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. N.15*: 473-497.
- Oiyama, I., et Okudai, N. 1983. Studies on the polyploidy breeding in citrus. III Occurrence of triploids in progenies of sweet orange crossed with diploids. *Bull. Fruit. Tree. Res. Sta. Kuchinotsu. D*: 5 1-8.
- Oiyama, I., et Kobayashi, S. 1991. Citrus pentaploids from seeds of diploids x diploid crosses. *Hort. Scie.* Vol: 26. N 292 - 293
- Oiyama, I. et Kobayashi, S. 1990. Polyembryony in undeveloped monoembryonic diploid seeds crossed with a citrus tetraploid. *Hort. Sci.* vol 25. N 10:1276-1277.
- Ollitrault, P. et De Rocca Serra, D. 1992. L'amélioration des agrumes : II Créations variétales et Biotechnologies. *Fruit. N.17* : 124-134.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F., and Duperray, C. (1995). Nuclear genome size variations in Citrus. *Fruits*. *Fruits* 49.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Allent, V., Luro, F., and Jacquemond, C. (1996a). In vitro rescue and selection of spontaneous triploids by flow cytometry for easy peeler citrus breeding. In "VIII International Citrus Congress", Vol. 1, pp. 254-258. International Society of Citriculture, Sun City, South Africa.
- Ollitrault, P., Allent, V., and Luro, F. (1996b). Production of haploid plants and embryogenic calli of clementine (*Citrus reticulata* Blanco) after in situ parthenogenesis induced by irradiated pollen. *Proc. Int Soc. Citric.* 2, 913-917.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Sudahono, Mademba-Sy, F., Vanel, F., Luro, F., and Aubert, B. (1998a). Biotechnology for triploid mandarin breeding. *Fruits* 53, 307-317.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Vanel, F., and Froelicher, Y. (1998b). Creation of triploid Citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplasts. In "Acta Horticulturae, First International Symposium on Citrus Biotechnology" (R. Goren and G. E.E., eds.), Vol. 535, pp. 191-197. ISHS.
- 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*, N. 9, 223-236.
- Russo, F., et Torrisi, 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.
- Soost, R. K., and Cameron, J. W. (1975). Citrus. In "Advance in fruit breeding" (J. J. and M. J.N., eds.), pp. 507-540. Purdue University Press, West Lafayette.
- Soost, R. K. et Cameron, J.W. 1985. 'Melogold' a triploid pummelo-grapefruit hybrid. *Hort Science*. N20 : 1134-1135.
- Soost, R.K. et Cameron, J.W. 1980. 'Oroblanco' triploid pummelo-grapefruit hybrid. *Hort Science*. N.15 : 667-669.
- Starrantino, A.; et Reforgiato Recupero, G. 1982. Citrus hybrids obtained in vitro from 2x female X 4x males *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1:31-32.
- Starrantino, A. 1995. Use of triploids for production of seedless cultivars in citrus improvement programs. *Proc. Int Soc. Citriculture*. N. 117-121.
- Starantino, A. 1997. Citrus breeding. Conventional and modern technique. *Rivista di Frutticoltura ed orto floricultura*. Vol 59, N. 12: 7-15.
- Tachikawa, T. 1973. Producing tetraploid and triploid citrus fruits and their characteristics. I Congreso. *Mundial Dz Citricultura*. Vol2 : 45-51. Cité par Lee, L.S. 1988. Citrus polyploidy-origins and potential for cultivar improvement. *Australien. J. Agri. Research*. N 39 : 735-747.
- 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 cultivars improvement, *Hort Science*, N.27 : 445-447.