



Identification de l'origine de gamètes parentaux diploïdes et mode de restitution nucléaire des hybrides spontanément triploïdes de mandariniers

Handaji N. ¹, Arsalane N. ¹, Benyahia H. ¹ et Ibriz M. ²

1- Institut National de la Recherche Agronomique, CRRRA de Kénitra, BP. 257
Kénitra - Maroc.

2- Université Ibn Toufail et Faculté des Sciences, Kénitra

Pour correspondance : citrusinra@yahoo.fr

Résumé

La recherche des variétés triploïdes est une voie extrêmement prometteuse dans un programme d'amélioration variétale des agrumes et un atout majeur pour le marché des agrumes frais. En effet, la stratégie retenue s'appuie sur la sélection d'évènements rares de la triploïdisation spontanée (via la formation de gamètes diploïdes). Les travaux réalisés avaient spécialement pour objectif d'étudier l'origine génétique de ces triploïdes par les isozymes. Deux séries de croisements diploïdes ont été réalisées, la première correspond à des croisements simples, entre la clémentine Sidi Aissa et huit parents mâles de mandarinier (Wilking, Chienka, Carvalhal, Chuika, Satsuma Wase, Lee, Robinson et Osceola). Tandis que la deuxième série correspond à des croisements diallèles et réciproques, entre trois variétés (Sidi Aissa, Cravo et King of Siam). Les pépins sont extraits des fruits mûrs et les embryons immatures dérivés des pépins anormaux ont été mis en culture *in vitro* sur un milieu de Murashige and Skoog avec un supplément de 1mg/l de l'acide gibbérellique. Les plantules triploïdes identifiées par la cytométrie en flux ont été ensuite analysées par l'électrophorèse enzymatique, l'on a en recours aux trois systèmes enzymatiques (IDH, PGI, PGM).

Cent onze hybrides triploïdes ont été obtenus par l'analyse par la cytométrie en flux. L'analyse enzymatique des feuilles de ces hybrides a permis de montrer que l'induction spontanée de la triploïdie est originaire de la fusion des ovules non réduit et de pollen haploïde. Par ailleurs, comme la connaissance du mode de restitution des gamètes $2n$ est importante pour mieux raisonner la création variétale, cette analyse a montré que la majorité des triploïdes étudiés sont issus des ovules diploïdes ne conservant que partiellement l'hétérozygotie maternelle.

Mots clés : Agrumes, mandarine, triploïdie, sauvetage d'embryons, cytométrie en flux, isozymes.

البحث عن أصل الأمشاج الثنائي (2n) عند المندرين ثلاثية الصبغة

هندجي نجاة، أرسلان نجاة، ابن يحيى حميد، وإبريز محمد

ملخص

ان التضاعف الصبغي للحمضيات يعطي امكانيات كثيرة لخلق أصناف جديدة مختلفة الصيغة بواسطة طرق تهجين خاصة. ان الشكل الوراثي ثلاثي الصبغة ($2n = 3x = 27$) الذي يهمننا في هذه الدراسة يتميز عند الحمضيات بغياب البذور، بالإضافة الى خاصيات أخرى (الشكل الخارجي والموغفولوجي والمواصفات الكيماوية) تتعلق باختيار الأباء وبنجاح عملية التهجين. قمنا بسلسلتين من التهجين: الأولى تتعلق بتهجين كليمانتين سيدي عسى (والد مؤنث) مع ثمانية آباء مدكرة من المندرين. أما السلسلة الثانية تتعلق بتهجين متبادل بين ثلاثة أنواع من المندرين. بعد إضاج الفاكهة، تم استخراج البذور ذات الأجنة الغير الناضجة وزرعهم في وسط إصطناعي (SM) يحتوي على 1 مغ/ل من ساعد على x الهرمونات (A.G). ان تقييم مستوى الصيغ الصبغية للهجن الناتجة عن تقنية ستومتر التمييز بين الصيغة الثلاثية (111 شجيرة). تساعد دراسة النباتات الثلاثي الصيغة بالتهجير الكهربائي الأنزيمي على إعطاء توضيحات على أصل الأمشاج الثنائي (2n) وكيف تم تكوينها. لهذا اخترنا ثلاثة مجموعات أنزيمية (PGM/ PGI/ IDH) وقد تبين أن أغلبية النبات الثلاثية الصيغة أصلها من أمشاج ثنائية ورثت من الوالد المؤنث.

الكلمات المفتاحية : الحوامض، المندرين، تلقيح، انقاد أجنة غير ناضجة، ثلاثي الصيغة الصبغية، ستومري دو فلي، التهجير الكهربائي الأنزيمي.

Identification of 2n gamete parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid Citrus hybrid

Abstract

Triploidy has played an important role in development of new seedless mandarin cultivars for fresh fruit market. The present work was undertaken to identify gamete diploid origin. Two series of diploid x diploid crosses were assessed. The first related to simple crosses between monoembryonic female parent "Clementine Sidi Aissa" and eight males parents "mandarins" (Wilking, Chienka, Carvalhal, Chiuka, Satsuma Wase, Lee, Robinson and Osceola). While the second is a complete by diallel and reciprocal crosses released between three cultivars Sidi Aissa, Cravo and king of Siam. At maturity, the fruits have been harvested, and small embryos were extracted from undeveloped seed and cultured on medium of Murashige and Skoog supplemented with 1mg/l acid gebberilic. Triploid seedlings selected by flow cytometry analysis were characterized by isozymes systems (PGM, PGI and IDH) on starch gel electrophoresis.

Hundred eleven triploids were obtained by flow cytometer analysis. Isozymes analysis showed that most of the triploid arise from diploid ovules with a partial transmission of maternal heterozygosity. This method of triploids production is promising and will allow obtaining large population of triploid hybrids having good potential for superior cultivars.

Key words: Citrus, mandarins, embryos rescue, triploidy, flow cytometry, isozymes

Introduction

Les variétés triploïdes sont, en général, stériles. Elles représentent une plus grande vigueur et une taille de fruit supérieure aux variétés diploïdes. De nombreuses études sur la triploïdie ont été explorées à l'échelle nationale (Handaji *et al.*, 2000, 2001, 2002, 2005; Handaji, 2003 et Hmouni *et al.*, 1999, 2000 et 2005) et internationale (Esen et Soost, 1971; Ollitrault et Faure, 1992; Ollitrault et De Rocca Serra, 1992 ; Ollitrault et Michaux Ferriere, 1992 ; Ollitrault et De Rocca Serra, 1992; Ollitrault, *et al.*, 1995, 1998, 1999 ; Fatta Del Bosco *et al.*, 1992). La recherche des hybrides triploïdes spontanés issus de croisements entre deux parents diploïdes a mis en évidence deux hypothèses : soit la progéniture triploïde est issue de l'union des gamètes femelles non réduits avec des gamètes mâles réduits (18+9), soit elle est obtenue par la fusion des gamètes femelles réduits avec des gamètes mâles non réduits (9+18). Esen et Soost, (1971) ont rejeté l'hypothèse du pollen diploïde. En revanche, plusieurs triploïdes spontanés sont obtenus par la fusion de gamètes femelles non réduits et de gamètes mâles réduits (Oiyama et Okudai, 1983). 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, 1973a, 1977; Esen et al., 1979 ; Gerarci *et al.*, 1975, 1976 et 1982 ; Gottlieb, 1982). Le mécanisme probable de la production des mégaspores non réduits est soit l'absence de la seconde division méiotique (le gamète femelle conserve le même génotype), soit il y a un dédoublement chromosomique juste après la méiose (le gamète femelle homozygote).

Par ailleurs, l'utilisation des marqueurs enzymatiques (électrophorèse d'isozymes) permet d'apporter des éclaircissements sur le mode de formation des gamètes diploïdes et de formuler des hypothèses sur la valeur génétique des triploïdes obtenus : Maintien de l'hétérozygotie des gamètes diploïdes, ou bien renforcement de l'homozygotie par endoduplication de gamètes haploïdes.

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 (hétérozygotie, diversité allélique) ainsi que l'organisation de la diversité (relations interspécifiques) et les mécanismes de l'évolution (reproduction sexuée et multiplication végétative) (Esen et Soost, 1977; Torres *et al.*, 1982 ; 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 Cameron., 1980 et Roose et Traugh, 1988). Aussi, ils ont été utilisés soit pour l'identification des triploïdes (King *et al.*, 1996), soit pour étudier le mode de formation de gamètes diploïdes (Luro *et al.*, 2000).

Au cours de cette étude, seuls les isozymes ont été utilisés car ils sont très simples et moins coûteux. Ces analyses ont été effectuées au laboratoire de CIRAD FHLOR France. La vérification de la nature hybride par électrophorèse enzymatique et la détermination pour chaque hybride triploïde du profil moléculaire permettant son identification avec certitude.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Cent onze hybrides triploïdes identifiés par la cytométrie en flux et les parents diploïdes ont été analysés par les isozymes (Tableau 1).

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

Série 1 : Croisements simples

	Wilking	Chienka	Carvalho	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 mandarine Wilking)

Série 2 : Croisements réciproques et diallèles

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

2. Méthodes

L'identification morphologique des hybrides triploïdes n'est possible que lorsque la plante atteint le stade de floraison ou fructification ce qui rallonge considérablement les programmes de sélection. C'est pour cela que l'on a recours à la caractérisation par isozymes qui permet d'identifier ces hybrides dès les stades les plus précoces de leurs développements ce qui est important pour les programmes d'amélioration des variétés. Cette caractérisation est faite à l'ordre de l'électrophorèse enzymatique qui est fréquemment utilisée pour l'identification de l'origine et du mode de formation des gamètes diploïdes. Le protocole suivi est celui utilisé par Handaji *et al.*, 2005a. La numérotation des allèles a été faite suivant le sens de migration. Les isozymes ayant migrées le plus lentement sont notés : **S**, les moyens : **M** et le plus rapidement : **F**.

Résultats et discussion

Etude enzymatique des hybrides triploïdes par les isozymes

Pour une bonne interprétation, il faut savoir que les PGM sont des enzymes monomères (constitués d'une seule protéine), tandis que les PGI et IDH sont dimériques (constitués de deux protéines différentes associées). Pour un individu homozygote, le profil enzymatique se présente en une seule bande (enzymes mono ou dimériques), alors qu'un individu hétérozygote présente deux bandes (quand l'enzyme est monomérique) et trois bandes quand l'enzyme est dimérique.

L'origine parentale de 111 hybrides triploïdes a été identifiée sur la base de l'évaluation quantitative des isozymes. Les isozymes ont permis de déterminer les profils enzymatiques de chaque hybride triploïde et de conclure que tous les hybrides obtenus sont conformes aux croisements réalisés surtout pour le cas des plantules issues des parents femelles polyembryonnés (Cravo et King of Siam). Les profils enzymatiques de différents triploïdes ont été reportés dans le tableau 2. Vu le nombre élevé des échantillons, on s'est limité à la présentation détaillée des hybrides de la combinaison C1 (Sidi Aissa X Wilking).

Le système enzymatique PGI

Le système enzymatique PGI montre deux zones de coloration : la première zone la plus lente présente une ou trois bandes et correspond au locus PGI-1 polymorphique et à structure dimérique. La deuxième est plus rapide et présente une bande monomorphique qui pourrait correspondre à un locus PGI-2. Au niveau de locus PGI-1, Les variétés de mandariniers, (Wilking, Satsuma Wase, Chienka, Chuika et King of Siam), sont homozygotes et les autres sont hétérozygotes.

Tableau 2. Etude de la reconstitution génétique et l'origine du gamète diploïde pour chaque profil enzymatique des triploïdes

Au niveau du locus PGI-1

Combinaisons*	Profils enzymatiques		Reconstitution génétique	Origine des gamètes diploïdes
	Parents (♀ x ♂)	Triploïdes		
C2, C3, C6, C7, C8, C9	SF X SM	SSF SMF SFF MFF	Inconnue hétérozygote Homozygote Homozygote	Inconnue Inconnue Ovule Ovule
C1, C4, C5, C10	SF X MM	SMF	Hétérozygote	Ovule
C13	MM X SF	MMF	Homozygote	Ovule
C12	SM X MM	MMM SSM SMM	Homozygote Homozygote Inconnue	Inconnue Ovule Inconnue
C14	MM X SM	MMM	Homozygote	Inconnue

Au niveau du locus IDH

Combinaisons*	Profils enzymatiques		Reconstitution génétique	Origine des gamètes diploïdes
	Parents (♀ x ♂)	Triploïdes		
C5, C8, C4	SF X SF	SSF SFF	Inconnue Inconnue	Inconnue Inconnue
C12, C14	FF X FF	FFF	Inconnue	Inconnue
C13, C1	SF X FF	FFF SSF	Homozygote Homozygote	Inconnue Ovule
C2, C3, C6, C7, C9, C10	FF X SF	SFF	Inconnue	Inconnue

Au niveau du locus PGM

Combinaisons*	Profils enzymatiques		Reconstitution génétique	Origine des gamètes diploïdes
	Parents (♀ x ♂)	Triploïdes		
C2, C3, C4, C5, C8, C9	MF X MF	MMM FFF MMF MFF	Homozygote Homozygote Inconnue Inconnue	Inconnue Inconnue Inconnue Inconnue

S: Slow (allèle à vitesse lente) F: Fast (à vitesse rapide) M: Medium (à vitesse moyenne)

* : Les combinaisons regroupées possèdent les mêmes profils enzymatiques

Selon les profils enzymatiques des parents, les 14 combinaisons sont réparties en cinq groupes (Tableau 2).

L'identification de la structure génétique et de l'origine du gamète non réduit se base sur la comparaison entre les profils enzymatiques réellement obtenus avec les théoriques (Annexes 1 et 2).

- Le groupe 1 contient les combinaisons C2, C3, C6, C7, C8 et C9 ayant les profils enzymatiques hétérozygotes SF (parents femelles) et SM (parents mâles). Les hybrides triploïdes de génotype SFF et MFF sont issus des ovules homozygotes car l'allèle F n'existe que chez le parent femelle. Tandis que les triploïdes SMF sont issus de gamètes diploïdes hétérozygotes d'origines inconnues.

- Le groupe 2 contient les combinaisons C1, C4, C5 et C10 dont les parents sont génétiquement différents au niveau de ce locus PGI, tels que SF (parents femelle) et MM (parents mâles). Les triploïdes (SMF) sont issus d'ovules diploïdes hétérozygotes.

- Le groupe 3 contient la combinaison C13 dont les profils enzymatiques des parents sont réciproques à ceux du groupe 2. Les triploïdes MMF sont issus d'ovules diploïdes homozygotes.

- Le groupe 4 contient la combinaison C12 dont les parents sont génétiquement proches, tels que SM (parents femelles) et MM (parents mâles). Les triploïdes SSM sont issus d'ovules diploïdes homozygotes puisque l'allèle S ne se trouve que chez le parent femelle.

- Le groupe 5 contient la combinaison C14 dont les profils enzymatiques des parents sont réciproques à ceux du groupe 4. Les triploïdes MMM sont issus de gamètes diploïdes homozygotes d'origines inconnues

Au niveau de ce locus PGI-1, la majorité des hybrides triploïdes sont issus d'ovules non réduits (homozygotes ou hétérozygotes). Quand les deux parents sont génétiquement différents (Cas de SFXMM), il est très facile d'identifier l'origine du gamète diploïde.

Le système enzymatique IDH

Au niveau du locus IDH, quatre groupes de combinaisons ont été mis en évidence, tels que :

- Les groupes 1 et 2 comportent des parents génétiquement identiques et il est par conséquent, très difficile d'identifier l'origine de gamètes diploïdes.

- Les groupes 3 et 4 ne donnent aucune information sur le mode de formation de gamètes diploïdes à l'exception des triploïdes SSF qui sont issus d'ovules diploïdes homozygotes.

Le système enzymatique PGM

Au niveau de ce locus, trois groupes ont été mis en évidence. Les triploïdes obtenus sont issus d'ovules diploïdes homozygotes, gamètes diploïdes hétérozygotes ou d'origine inconnue.

L'électrophorèse enzymatique nous a permis de constater que la fiabilité des résultats dépend en grande partie du caractère constitutif des systèmes enzymatiques. Le système enzymatique le plus efficace, comme marqueur pour l'identification de la structure et l'origine génétique des gamètes non réduits, semble être le PGI.

Le mode de restitution employé durant la méiose est l'étape principale pour la formation des gamètes diploïdes homozygotes ou hétérozygotes. En réalité, deux possibilités majeures ont été considérées : la première division de restitution (PDR) permet la formation des gamètes diploïdes avec des chromatides non sœurs et la deuxième division de restitution (DDR) donne des gamètes diploïdes avec des chromatides sœurs. Par conséquent, la PDR retient l'hétérozygotie de la cellule mère, alors que la DDR augmente l'homozygotie dans les cellules gamétiques.

Pour l'évaluation du mode de restitution employé durant la méiose et qui donne les gamètes diploïdes, nous avons calculé le pourcentage de l'hétérozygotie et de l'homozygotie au niveau du locus PGI. La valeur moyenne de l'hétérozygotie entre les triploïdes originaires de fusion gamétique entre n (pollen haploïde) et $2n$ (ovule) est de 54% et celle de l'homozygotie est 11%. Parmi 111 triploïdes, 65% sont issus de gamètes diploïdes hétérozygotes et 3% sont issus de gamètes diploïdes homozygotes. En revanche 32% des plantules hybrides n'ont pas pu être identifiés par les isozymes du fait que le parent femelle est homozygote ou ayant au moins un allèle en commun avec le parent mâle (Figure 1).

Le pourcentage de l'identification de l'origine des gamètes a été positivement corrélé avec le polymorphisme et le niveau de l'hétérozygotie pour les marqueurs utilisés.

Les isozymes sont insuffisamment polymorphes pour l'identification de l'allèle dans les croisements entre parents proches mais, ils permettent l'identification quantitative de la balance allélique parentale par leurs combinaisons hétéro duplications. Les marqueurs idéaux pour déterminer l'origine parentale de n'importe quel triploïde doivent être polymorphes. Le mode de formation des gamètes diploïdes est facilement identifiable par le système enzymatique dimérique PGI et quand les parents sont polymorphes.

L'analyse enzymatique est insuffisante pour identifier totalement l'origine de gamètes diploïdes quand les deux parents sont génétiquement proches. C'est pourquoi, il est nécessaire de rechercher d'autres marqueurs qui s'adressent directement aux génotypes (ADN), et permettent une analyse quantitative des génomes nucléaires.

Les enzymes dimériques représentent la situation la plus favorable pour cette analyse quantitative des hybrides triploïdes. Ils sont reliés à des différences visibles entre la grande quantité des association hétéro-duplication des sous unités de la protéine et la faible quantité des protéines homo-duplication.

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Gottlieb (1982) et King, *et al.* (1996) et Luro *et al.* (2000) qui ont montré que les autopolypoïdes et leurs parents ne se distinguent pas par les isozymes. Ces chercheurs ont montré aussi que les triploïdes spontanés sont issus des ovules diploïdes. La diplogamétogénèse correspond à la formation spontanée des gamètes diploïdes au cours de la première ou la seconde division de la méiose. (PDR: la première division de restitution; la gamète ne subit qu'une mitose et conserve le génotype diploïde du parent femelle. DDR: la deuxième division de restitution; le gamète subit une méiose, devient haploïde puis subit une duplication pour obtenir à la fin un gamète diploïde homozygote.

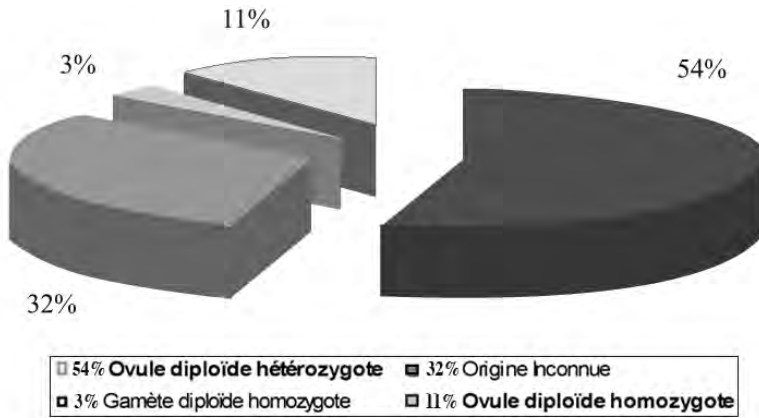


Figure 1: Pourcentage des plantules hybrides triploïdes issues de gamètes diploïdes pour tous les croisements confondus

Conclusion et perspectives

La connaissance du mode de restitution des gamètes $2n$ est importante pour mieux raisonner la création variétale. L'étude de trois systèmes enzymatiques (IDH, PGI, PGM) a permis de donner des éclaircissements sur le mode de formation et l'origine des gamètes diploïdes. L'origine des $2n$ gamètes a été analysée à l'aide de ces marqueurs enzymatiques sur une population de 111 triploïdes issus d'hybridation sexuée entre parents diploïdes. La quasi-totalité des gamètes diploïdes paraissent d'origine maternelle. Pour certains individus, l'hétérozygotie maternelle n'est pas restituée. En effet, la valeur génétique des hybrides triploïdes serait importante dans le cas de la restitution de l'hétérozygotie.

Le nombre de marqueurs étudiés est toutefois insuffisant pour prévoir de façon plus précise l'étape de la méiose qui est perturbée. Pour mieux connaître la structure génétique et l'origine des gamètes diploïdes, une autre étude sur le dosage allélique combinée avec les isozymes doit être menée dans le futur pour compléter les analyses des hybrides triploïdes faits lors de ce travail. L'étude enzymatique confirme bien que 65% de gamètes diploïdes proviennent des parents femelles.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier l'équipe du laboratoire d'Amélioration des plantes du CIRAD FLHOR Montpellier et de l'INRA Corse France.

Références bibliographiques

- Esen A. et Soost RK.** 1977. Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophyte and embryo: endosperm ploidy ratio in citrus. In: Proc. Inter. Soc. Citriculture, Vol II: 53- 63
- Esen A. et Soost RK.** 1973. Precocious development and germination of spontaneous triploids seeds in Citrus. J. Heredity. N64: 147- 154
- Esen A. et Soost RK.** 1971. Unexpected triploid in Citrus. Their origin, identification and possible use. J. Heridity. N62: 329-333
- Esen A., Soost. RK. et Gerarci, G.** 1979. Genetic evidence for the origin of diploid megagametophytes in Citrus. J. Heridity. N70: 5-8
- 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.
- Gerarci, G. Esen, A. et Soost. R.K.** 1975. Triploid progenies from 2xX2x crosses of Citrus cultivar. J. Heridity N66: 177-178
- Gerarci G., De Pasquale F. et Tusa N.** 1976. Incidenza della triploida su alcune cultivar diploidi di mandarini limoni. Riv Ortofrutt. Italiana. N60 :127-131
- Gerarci, G., Starrantino, A., Reforgiato Recupero G. et Russo F.** 1982. Spontaneous triploid in progenies of monoembryonic hybrids of clementine commune X king of Siam. Genetic Agr N36: 113-118.
- Gottlieb L.** 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. Science 216 : 373-380
- Handaji N., Cabrita L., Ait Haddou MM. et Leitao J.M.** 2005. Identification de la mandarine Afourer comme hybride de Murcott honey par les isozymes. Al Awamia N112. p : 75- 85.
- Handaji N., Hmouni D., Arsalane N.** 2000. Research of new citrus triploids from diploid crosses between clementine and eight mandarins. IX citrus international congress in Florida 3-7 December 2000.
- Handaji N., P. Ollitrault, N. Arsalane et Dambier D.** 2001. Etude de la formation des gamètes diploïdes chez les hybrides triploïdes issus de croisement réciproque 2xX2x entre la clémentine Sidi Aissa et mandarine Cravo et King of Siam. 1^{er} Colloque de l'Agriculture sur le thème, développement agricole et recherche Agronomique dans la région du Gharb-Chrarda Bni et perspectives Résumé et Posters.
- Handaji N., Ollirault P., Arsalane N. et Hmouni D.** 2002. Triploïdie une perspective d'amélioration génétique des agrumes. Al Awamia N106 : 1_14.
- Handaji N.** 2003. Développement d'un programme de sélection de mandariniers triploïdes aspermes pour l'agriculture marocaine. Mémoire pour l'accès au grade d'ingénieur en Chef. 75 pages (INRA/UR ACRPHG Kenitra).
- Handaji N., Cabrita L., Ait Haddou MM. et Leitao JM.** 2005a. Identification de la mandarine Afourer comme hybride de Murcott honey par les isozymes. Al Awamia N112. : 75- 85.
- Handaji N., Dambier D., Chahbar A., Arsalane N., Hmouni D., Benyahia H. et Ollitrault P.** 2005b. Etude de facteurs influents sur la production de triploïdes par hybridation entre clémentiniers et mandariniers diploïdes. Al Awamia N113 : 27- 46.

- Handaji N., Arsalane N., Lamarti A., Dambier D., H. Benyahia, Maignizo H., Cheikh O.Y., Et Ollitrault P.** 2005c. Induction de l'embryogenèse somatique et régénération des plantules chez les mandariniers (*Citrus reticulata* L.). Al Awamia N114: 107-122.
- Handaji N., Ait Haddou MM. et Benyahia H.** 2005d. A proposal for the diversification the mandarins and oranges varieties in Morocco. International congress of Nurserymen citrus (*une communication orale*). (Egypt : 19 au 22 Septembre 2005).
- Hmouni D., Handaji N., Arsalane N. et Rachidi M.** 1999. Microbouturage *in vitro* et greffage *in vivo* des plantules triploïdes de Citrus. Al Awamia N101 : 9-24.
- Hmouni D., Handaji N. et Rachidi M.** 2000. Microbouturage *in vitro* et greffage *in vivo* des plantules triploïdes de Citrus. Abstract. Africain Crop Science Conférence Faculté de science Meknès.
- Hmouni D., Handaji N., Arsalane N. And Rachidai N.** 2005. Citrus triploids from immature embryos of diploid clementine Sidi Aissa x diploid mandarin crosses. Atelier "les biotechnologies au Maroc. 6 mai 2005 FST Settat.
- King BK., Lee LS. and Scott PT.** 1996. Identification of triploids Citrus by isozymes analysis. Euphytica N90 :223-231
- Luro F., Maddy F., Ollitrault P. et Rist D.** 2000. Identification of 2n gamete parental origin and mode of nuclear restitution of spontaneous triploid Citrus Hybrid. Proceedin of Int. Soc. Of citriculture.
- Ollitrault P.** 1990. Isozymes and RFLP'S as genetic markers in citrus selection. In Proc. 4 th Asia Pacific conf. On citrus rehabilitation. FAO UNDP RAS/ 86/022 reg proj 57-68
- Ollitrault P.** 1992. Research of seedless willow leaf mandarin by gamma irradiation. VII International Citrus Congress. Acireale (Italy) March: 8-13.
- 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. et Michaux Ferriere N.** 1992. Etude critique de la technique de cytométrie en flux appliquée à l'amélioration des plantes : résultats obtenus pour quelques agrumes. Fruit. Numéro spécial agrumes.
- Ollitrault P., Dambier D. et Luro F.** 1995. Nuclear genome size variation in Vitrus. Fruit. Vol 49. N5-6: 391-393
- 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.
- Ollitrault P., Luro F. Allent V. et Dambier D.** 1995. Diversification des mandarines ; apport des biotechnologies pour la création des cultivars triploïdes aspermes. SRA de corse; Symposium mandarine. 5 au 11 mars 1995.
- Ollitrault P., Dambier D., Sudahono Mademba Sy., Vanel F., Luro F. et Aubert B.** 1998. Rootctock breeding strategies for Mediterranean Citrus industry: the somatic hybridisation potentiel, Fruit, vol 53. N5: 307-317.

- Ollitrault P., Dambier D., Sudahono, Mademba Sy., Vanel F., Luro, F. et Aubert, B.** 1998. Sélection de mandarins triploïdes à l'aide des biotechnologies. *Fruit*, vol: 53. N5: 307-317.
- Ollitrault P., Dambier D., et Vanel F.** 1999. Creation of triploid citrus hybrids by electrofusion of haploid and diploid protoplast. Abstract p: 135 (3rd latin american meeting on plant biotechnology (Juin 1999, Cuba).
- 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.
- Roose M. I., et Traugh SN.** 1988. Identification and performance of Citrus trees on nucellar and zygotic rootstocks. *J Amer. Soc. Hort. Sci. N.* 113: 100-105
- Soost R.K. et Cameron, JW.** 1980. 'Oroblanco ' triploid pummelo-grapefruit hybrid. *Hort Science*. N15 : 667-669.
- Torres AM., Soost RK. et Diedehofen U.** 1978. Leaf isozymes as genetic makers in citrus *An. J. Bot.* 65: 869-881.
- Torres AM., Soost RK. and Mau-Lastovicka T.** 1982. Citrus isozymes: genetics and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. *J. Heredity* N73: 335-339.

Annexe 1 : Profils enzymatiques théoriques des hybrides triploïdes de mandarinier issus des ovules diploïdes ou pollen diploïdes

a/ Exemple bien détaillé

Combinaison parentale	Profils enzymatiques			
	Ovules diploïdes		Pollens diploïdes	
	PDR	DDR	PDR	DDR
SF X MM	(SF)M	(SS)M (FF)M	S(MM) F(MM)	S(MM) F(MM)
SF X SM	(SF)S	(SS)S	(SM)S	S(MM)
	(SF)M	(SS)M (FF)S	(SM)F	S(SS) F(MM)
MM X SF	(MM)S	(FF)M (MM)S	M(SF)	F(SS) M(SS)
	(MM)F (MM)S	(MM)F (MM)S	M(SM)	M(FF) M(SS)
MM X SM	(MM)M	(MM)M		M(MM)

(SF) : ovule hétérozygote diploïde (Reconstitution de l'hétérozygotie)

b/ Au niveau de PGI

Profils enzymatiques				
Parent ♀	Parent ♂	Ovules diploïdes	Pollens diploïdes	
SF	SM	SSS SSM <u>SSF</u> <u>SMF</u>	SSS SMM SSM <u>SSF</u> MM F <u>SMF</u>	
		<u>SFF</u> <u>MFF</u>		
SF	MM	SSF <u>SMF</u> MFF	SMM MMF	
SM	MM	SSM <u>SMM</u> MMM	<u>SMM</u> MMM	
MM	SF	SMM <u>MMF</u>	SSM SMF MFF	
MM	SM	SMM <u>MMM</u>	SSM SMM MMM	

c/ Au niveau du locus IDH

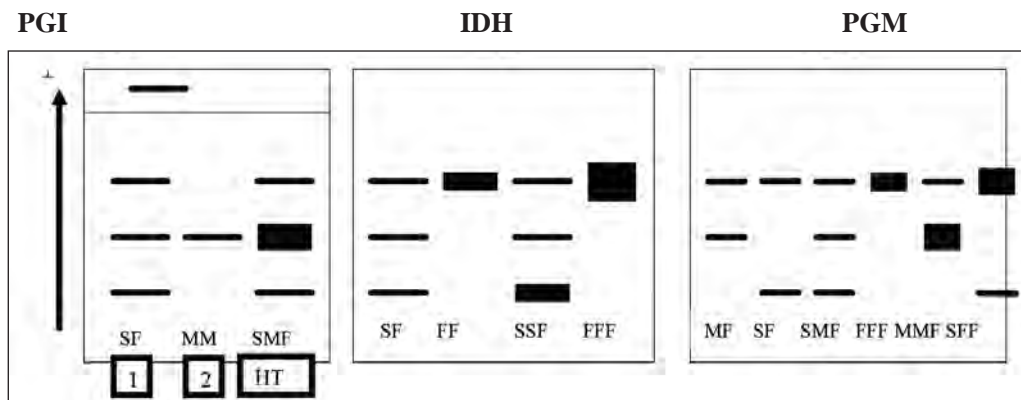
		Profils enzymatiques	
Parent ♀	Parent ♂	Ovules diploïdes	Pollens diploïdes
SF	SF	SSF SFF FFF SSS	SSF SFF FFF SSS
SF	FF	SSF SFF FFF	SFF FFF
FF	SF	SFF FFF	SSF SFF

d/ Au niveau du locus PGM

Profils enzymatiques			
Parent ♀	Parent ♂	Ovules diploïdes	Pollens diploïdes
MF	MF	MMF MMM MFF FFF	MMF MMM MFF FFF
MF	SF	SMM SMF SFF MMF MFF FFF	SSM SMF MFF SSF SFF FFF
SF	MF	SMM SMF MFF SSF SFF FFF	SMM SMF SFF MMF MFF FFF

Les génotypes triploïdes notés en gras sont les génotypes réellement obtenus au cours de cette étude alors que ceux soulignés se trouvent dans les deux colonnes. Ils peuvent être issus de gamètes diploïdes mâles ou femelles.

Annexe 2 : Représentation schématique de l'analyse des zymogrammes des isozymes des hybrides triploïde de mandarinier issus de croisements entre la clémentine Sidi Aissa et la mandarine wilking



(1= Parent femelle Sidi Aissa 2= Parent mâle Wilking et HT= leur hybride triploïde)

