Induction de cals embryogènes d'agrumes par culture d'ovules. Détermination isoenzymatique de l'origine tissulaire des embryons.

P. OLLITRAULT, Frédérique OLLITRAULT et Cécile CABASSON*

INDUCTION OF EMBRYOGENETIC CITRUS CALLI THROUGH OVULE CULTURE ISOZYME DETECTION OF THE ORIGIN OF EMBRYOS.

P. OLLITRAULT, Frédérique OLLITRAULT and Cécile CABASSON.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 204-212.

ABSTRACT - Embryogenic citrus calli offer numerous avenues for varietal creation and true-to-types mass propagation of rootstocks. Our studies were based on fertilized or unfertilized ovules, sampled from six citrus species : *C. aurantium, C. sinensis, C. reticulata, C. limon, C. aurantifolia, C. paradisi* and *Poncirus trifoliata*. Ovule excision was performed over the five weeks following anthesis and cultured on two different starting media: Murashige and Tucker (MT) without hormone and MT + Kinetin. Best results were obtained with ovules excised three weeks after anthesis. All the citrus species did produce embryos. But on the other hand, the three species *C. limon, C. aurantifolia* and *P. trifoliata* could not produce white embryogenic callus. A total of 123 cultivated vitroplants were analysed for four enzymatic systems. No embryo originated from the albumen or the gametic tissue could be detected. Whether embryogenesis was direct or not, most of the vitroplants were of somatic origin. Few zygotic embryos were obtained however by direct embryogenesis. It is therefore necessary to proceed with isozyme checking when establishing the initial lines of embryogenic calli. This procedure will easily indicate the exact origin of the callus if the corresponding ovules are submitted to controled cross pollination. In the case of open pollination, the efficiency of the technique will depend on the heterozygoty of the cultivar.

INDUCTION DE CALS EMBRYOGENES D'AGRUMES PAR CULTURE D'OVULES : DETERMINATION ISOENZYMATIQUE DE L'ORIGINE TISSULAIRE DES EMBRYONS.

P. OLLITRAULT, Frédérique OLLITRAULT et Cécile CABASSON.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 204-212.

RESUME - Les cals embryogènes d'agrumes offrent de nombreuses perspectives pour la création variétale et la propagation des porte-greffe. Des ovules fécondés et non fécondés de six espèces de *Citrus* (bigaradier, oranger, mandarinier, citronnier, limettier et pomelo) et du *Poncirus* Pomeroy, ont été prélevés durant 5 semaines après l'anthèse et mis en culture sur deux milieux d'induction (MT sans hormone, MT + kinétine). La réactivité des ovules est optimale 3 semaines après l'anthèse. Des embryons ont été obtenus pour toutes les variétés. En revanche, aucun cal friable embryogène n'a été induit à partir des ovules de citronnier, de limettier et de *Poncirus*. L'étude du polymorphisme de quatre systèmes enzymatiques a permis d'analyser l'origine tissulaire de 123 vitroplants. Aucun embryon originaire de l'albumen ou de tissus gamétiques n'a été observé. Que l'embryogenèse soit directe ou non, la plupart des vitroplants obtenus étaient d'origine somatique. Cependant quelques vitroplants zygotiques ont été obtenus par embryogenèse directe. Un contrôle isoenzymatique de l'origine tissulaire apparaît donc nécessaire lors de l'établissement des souches de cals embryogènes. Il sera suffisant pour s'assurer de l'origine somatique du cal si les ovules ont été préalablement allofécondés. Dans le cas de fécondations non contrôlées l'efficacité de cette technique sera alors fonction de l'hétérozygotie du cultivar.

INTRODUCTION

L'embryogenèse somatique *in vitro* et les techniques qui y sont liées prennent une importance croissante dans les programmes d'amélioration génétique des agrumes et pourraient également s'avérer très performantes pour la propagation de masse des porte-greffe. La mise en place de ces différents programmes nécessite, en premier lieu, la maîtrise de l'induction d'un cal embryogène d'origine somatique.

Classiquement, depuis le début des années 1970 (BUTTON et BORNMAN, 1971 ; MITRA et CHATURVEDI, 1972 ; KOCHBA et SPIEGEL ROY, 1973 ...), l'embryogenèse somatique est induite chez les agrumes par culture d'ovules, fécondés ou non. Le passage *in vitro* permet en effet d'amplifier le phénomène de polyembryonie nucellaire observé dans les pépins de très nombreux cultivars. Une corrélation significative a ainsi été notée entre le niveau de polyembryonie *in vivo* d'un cultivar et son aptitude à

* - P. OLLITRAULT et Frédérique OLLITRAULT - SRA San Giuliano IRFA-INRA - 20230 SAN NICOLAO
Cécile CABASSON - BIOTROP-CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex.

Croisements	Profils enzymatiques									Pourcentages de discrimination				
	Parents		Tissus de l'ovule											
	♀	♂	S	Z				A		Z/S	A1/S	A2/S	Z/A1	Z/A2
ABxCD	— —	— —	— — 1	— .25	— .25	— .25	— .25	— — — .5	— — .5	100	100	100	100	100
ABxBC	— —	— —	— — 1	— — .25	— .25	— — .25	— — .25	▬ — .5	— — .5	75	100	50	100	75
ABxAB	— —	— —	— — 1	— .25		— — .5	— .25	▬ — .5	— ▬ .5	50	100	0	100	50
ABxCC	— —	—	— — 1		— — .5		— — .5		— — — 1	100	100	100	100	100
ABxBB	— —	—	— — 1		— — .5		— .5		▬ — 1	50	100	0	100	50
AAxBC	—	— —	— 1		— — .5		— — .5	— ▬ .5	— ▬ .5	100	100	100	100	0
AAxAB	—	— —	— 1		— .5		— — .5	— .5	— ▬ .5	50	50	50	50	0
AAxBB	—	—	— 1			— — 1			— ▬ 1	100	100	100	100	0
AAxAA	—	—	— 1			— 1			— 1	0	0	0	0	0

FIGURE 1 - Principe de la discrimination des différentes origines tissulaires grâce aux isozymes.

A : albumen : A1 prise en compte de l'intensité relative des bandes
A2 prise en compte de la présence/absence de bandes
S : Somatique
Z : Zygotique

l'embryogenèse *in vitro* (MITRA et CHATURVEDI, 1972 ; KOBAYASHI *et al.*, 1982 ; MOORE, 1985). L'embryogenèse *in vitro* a également pu être obtenue à partir de différents tissus isolés de l'ovule tel que le nucelle (RANGAN *et al.*, 1969 ; BITTERS *et al.*, 1970), l'albumen (GMITTER *et al.*, 1990), ou les embryons immatures (RANGAN *et al.*, 1969).

Dans le cadre d'un programme d'embryogenèse somatique par culture d'ovules entiers, il apparaît nécessaire de contrôler l'origine tissulaire, et la conformité génotypique des vitroplants régénérés. Des descriptions de l'embryogenèse nucellaire *in vitro* (KOBAYASHI *et al.*, 1981 ; WAKANA et UEMOTO, 1987 et 1988) ont été réalisées grâce à des études histologiques. Ces dernières sont toutefois destructives et donc inadaptées au contrôle précité. L'étude du caryotype sur cals ou pointes de racines du vitroplant (GMITTER *et al.*, 1990) permet de déterminer le niveau de ploïdie des tissus. Cependant, cette technique reste insuffisante, puisqu'au niveau diploïde, elle ne permet pas de distinguer des plants zygotiques, somatiques ou dihaploïdes. L'électrophorèse d'isozymes, qui a auparavant été appliquée avec succès pour déterminer l'origine zygotique ou nucellaire des plants de semis d'agrumes (TORRES *et al.*, 1978 ; OLLITRAULT et FAURE, 1992), ou contrôler des fusions somatiques (BEN HAYYIM *et al.*, 1982 ; GROSSER *et al.*, 1988) paraît davantage appropriée à ce type de discrimination.

Dans le présent travail, l'étude des effets du génotype, de l'époque de prélèvement et du milieu de culture sur l'embryogenèse *in vitro*, s'accompagne d'une analyse du polymorphisme enzymatique qui permet de déterminer a posteriori l'origine tissulaire (gamétique, zygotique, de l'albumen, ou somatique) des embryons régénérés.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal et culture *in vitro*.

Les fleurs de cinq cultivars de *Citrus* [*C. sinensis* (L.) Osbeck cv. «Valencia late», *C. aurantium* L., *C. deliciosa* Tenore, *C. limon* L.) cv. «Eureka», *C. paradisi* L. cv. «Marsh»] ont été castrées, puis pollinisées par l'hybride mandarine Cléopâtre x *Poncirus*, ou non fécondées. *Poncirus trifoliata* cv. Pomeroy et *Citrus aurantifolia* cv. «Lime mexicaine» ont été autofécondés.

Les ovaires de ces 7 génotypes ont ensuite été prélevés durant les 5 semaines suivant l'anthèse. Les ovaires sont rincés dans de l'alcool à 70° pendant 2 minutes puis placés 10 minutes dans l'hypochlorite de sodium à 2 p. 100 avant trois rinçages à l'eau stérile. Les ovules sont ensuite isolés et placés sur un milieu solide dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre.

Deux milieux ayant pour base celui de MURASHIGE et TUCKER (1969) et contenant 50 g/l de saccharose et 500 mg/l d'extrait de malt ont été utilisés ; le premier sans adjonction d'hormone et le second additionné de kinétine 1 mg/l. Avant autoclavage, le pH est ajusté à 5,7 et les milieux additionnés de 10 g/l de Difco Bacto agar. Les boîtes de Pétri sont placées à 26°C sous une photopériode de 16 heures d'éclairement par 24 heures. Les repiquages sont effectués toutes les 4 à 5 semaines.

Pour la germination et l'élongation, 24 embryons cotylédonaires, bien conformés, de chaque génotype, sont isolés et repiqués individuellement en tube, sur le milieu sans hormone. La culture est effectuée dans les mêmes conditions physiques que précédemment. Quand la longueur de la tige des vitroplants atteint 3 à 4 cm, ils sont transplantés *in vivo* dans des «Jiffy pots» et placés en condition d'hygrométrie élevée pour l'acclimatation.

Electrophorèse enzymatique.

- Technique.

Pour chaque cultivar, à l'exception du pomelo, 18 à 22 vitroplants provenant d'ovules différents ont été analysés. Deux cents milligrammes de feuilles sont broyés dans 1 ml de tampon tris-HCl pH 7.2 additionné de cystéine 0.02 M et de triton 0.2 p. 100 en présence de PVPP. Après 20 minutes de centrifugation, le surnageant est conservé à -18°C.

Quatre systèmes enzymatiques ont été analysés. Trois [Phosphoglucose isomérase (PGI), Malate déshydrogenase (MDH), Isocitrate déshydrogenase (ICD)] sur gel d'amidon continu (Tampon tris-citrate pH 7) et le quatrième (Glutamate oxaloacétate transaminase : GOT) sur gel de polyacrylamide à 10 p. 100 (Tampon tris-borate EDTA, pH 8.3). Les révélations sont réalisées suivant les méthodes décrites par OLLITRAULT et FAURE (1992).

- Principe de détermination de l'origine tissulaire de l'embryogenèse.

Le principe est similaire à celui de la discrimination des plants de semis zygotiques et nucellaires (figure 1). Cette méthode permet de distinguer des vitroplants provenant d'un développement de tissus du zygote, de l'albumen, ou de tissus somatiques ou gamétiques. En revanche, l'origine exacte de l'embryogenèse somatique (nucellaire, tégumentaire, ...) ne peut pas être précisée.

L'information apportée par un locus varie en fonction de l'hétérozygotie du parent femelle et du nombre d'allèles en commun entre le parent femelle et le pollinisateur. Ainsi aux extrêmes, l'hétérozygotie du parent femelle combinée à l'absence d'allèle commun permet une discrimination totale entre les différentes origines, tandis qu'un locus homozygote et non polymorphe entre les deux parents n'apporte aucune information.

Lorsque plusieurs loci (n) sont analysés, le taux de discrimination entre deux origines (X et Y) est :

$DXY = 1-\pi(1\text{-}diXY)$ où diXY est le taux de discrimination du locus i entre les origines X et Y.

L'analyse des génotypes parentaux permet donc de connaître a priori la puissance de discrimination entre les différentes origines tissulaires.

RESULTATS

Réactivité des ovules.

La réactivité des ovules est estimée 60 jours après la mise en culture. Aucune différence significative n'a été observée entre les ovules fécondés ou non fécondés. C'est pourquoi les résultats relatifs à la callogenèse et à l'embryogenèse sont synthétisés, respectivement dans les tableaux 1a et 1 b, sans distinguer le type de fécondation. La réactivité des ovules paraît optimale pour les mises en culture réalisées environ 3 semaines après l'anthèse.

- Callogenèse.

La présence de kinétine (1 mg/l) dans le milieu favorise nettement la callogenèse. Celle-ci peut être de plusieurs types : 1) les cals obtenus à partir d'ovules de citronnier et de Poncirus sont très compacts et chlorophylliens (photo 1) ; 2) ceux de limettier sont compacts et jaunes ; 3) pour le pomélo et le bigaradier des cals compacts et quelques cals friables blancs ont été obtenus ; 4) enfin, la majorité des cals de mandarinier commun et d'oranger Valencia étaient blancs et friables (photo 2). Dans la suite de l'expérimentation, les cals blancs friables se sont avérés très embryogènes à l'inverse des cals compacts (seul les cals compacts verts de citronnier ont produit de rares embryons).

- Embryogenèse.

La kinétine apparaît défavorable à l'embryogenèse. Cette dernière peut être directe à partir des ovules (photo 3) ou indirecte après une phase de callogenèse (photo 4).

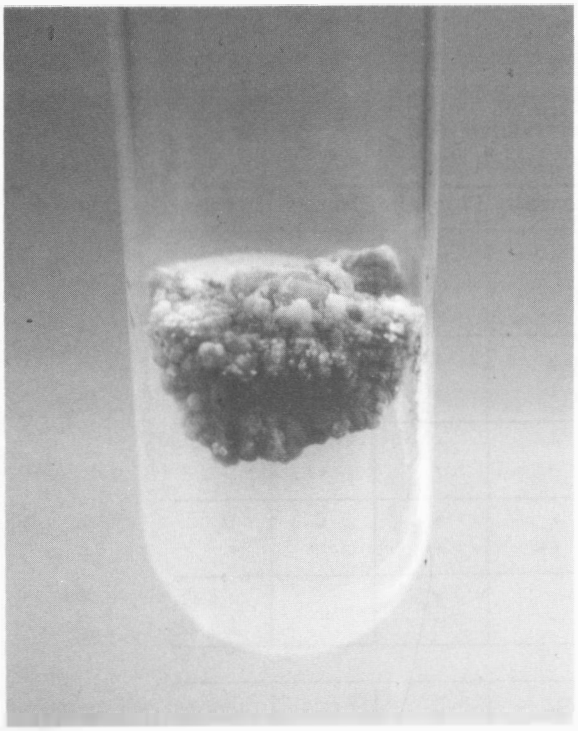

Photo 1 - Cal compact chlorophyllien de citronnier.

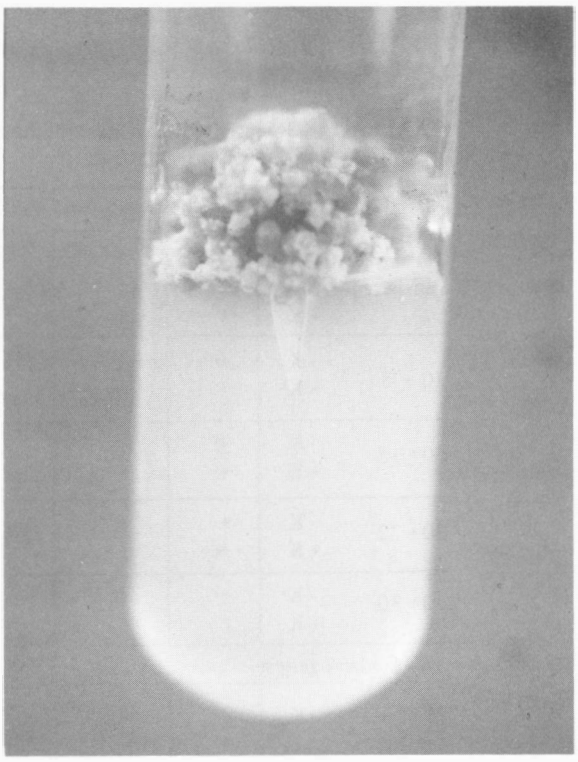

Photo 2 - Cal friable embryogène de mandarinier «commun».

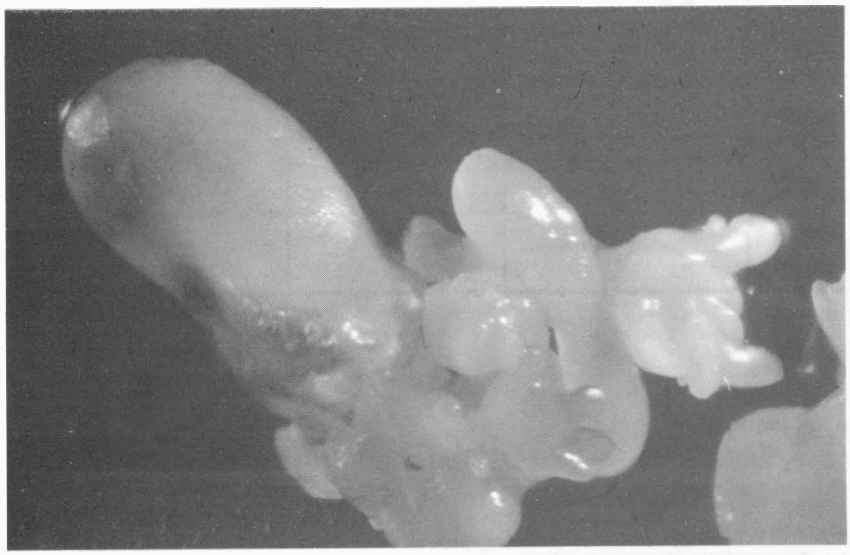

Photo 3
Embryogenèse directe à partir d'un ovule de Poncirus.

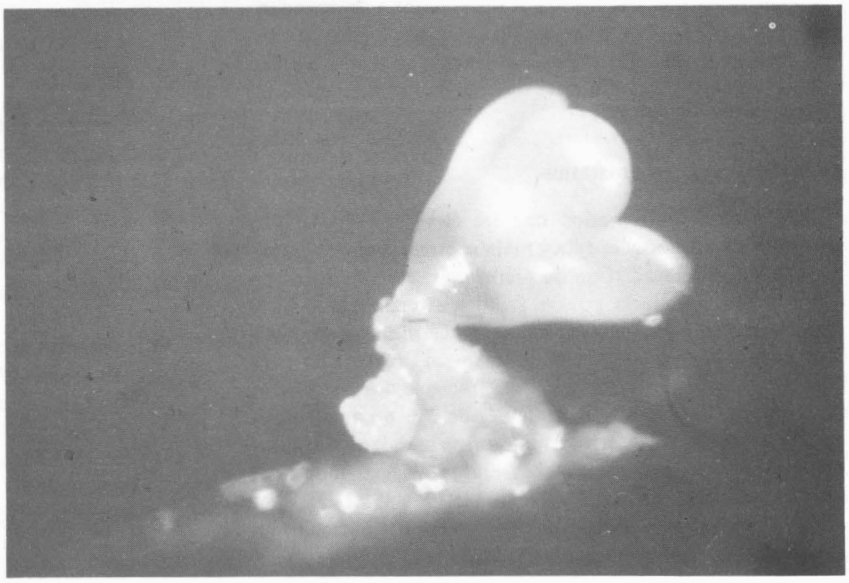

Photo 4
Embryogenèse indirecte (mandarinier commun)

TABLEAU 1 - Réactivité des ovules 60 jours après mise en culture.
1a - Callogenese.

		Oranger	Bigaradier	Mandarinier	Limettier	Citronnier	Pomélo	Poncirus
JO (anthèse)	- K	0	0	0	++	+	-	-
	+ K	+	+	+	++	+++	-	-
J0 + 8	- K	0	0	0	-	-	-	-
	+ K	+	++	+	-	-	-	-
J0+ 15	- K	0	+	0	-	-	0	0
	+ K	+	+	++	-	-	++	0
J0+ 22	- K	+	+	+	+	+	0	0
	+ K	++	++	+++	++	++	++	+
J0+ 30	- K	+	0	+	-	-	-	-
	+ K	+	+	++	-	-	-	-
1b - Embryogenèse								
J0 (anthèse)	- K	+	+	+	+	+	-	-
	+ K	0	0	0	+	0	-	-
J0+ 8	- K	0	+	++	-	-	-	-
	+ K	+	0	+	-	-	-	-
J0+ 15	- K	+	+	++	-	-	++	+
	+ K	+	+	+	-	-	+	+
J0+ 22	- K	++	+	++	+	+	++	++
	+ K	+	+	+	0	+	+	+
J0+ 30	- K	+	+	++	-	-	-	-
	+ K	0	0	+	-	-	-	-

- : traitement non étudié
0 : aucun ovule réactif
+ : moins d'un tiers des ovules sont réactifs
++ : moins des deux tiers des ovules sont réactifs
+++ : plus des deux tiers des ovules sont réactifs
- K : milieu sans kinétine
+ K : milieu avec kinétine

Les génotypes présentant la plus forte aptitude à l'embryogenèse *in vitro* ont été par ordre décroissant : le mandarinier Commun, le Poncirus Pomeroy et le pomélo Marsh. Une embryogenèse adventive importante a été observée à partir des embryons primaires de *Poncirus trifoliata.*

Elongation et acclimatation.

Les taux de germination ont été élevés (> 80 p. 100) pour l'ensemble des génotypes mais la croissance des jeunes plantules a été lente. Ces dernières ont été repiquées en «Jiffy pots» lorsque la pousse feuillée atteignait 3 à 4 cm (photo 5) soit environ 10 semaines après mise en germination. La phase d'acclimatation a également présenté un taux élevé de réussite (> 90 p. 100). Elle réclame 4 à 6 semaines pour obtenir des plants bien racinés de 6 à 8 cm susceptibles d'être cultivés en serre, en condition standard. Le pourcentage élevé de germination des embryons, par rapport à d'autres travaux (KOCHBA *et al.*, 1972 ; GMITTER et MOORE, 1986) peut s'expliquer par une sélection rigoureuse des embryons cotylédonaires repiqués.

Etude enzymatique.

- Caractérisation des variétés maternelles et du pollinisateur.

Les génotypes des différentes variétés et la puissance de discrimination entre les différentes origines tissulaires sont indiqués dans les tableaux 2 et 3. La présence d'au moins un locus hétérozygote pour chaque parent femelle permet de discriminer totalement les origines gamétique ou somatique des vitroplants obtenus par culture d'ovules non fécondés. La forte hétérozygotie du parent mâle (mandarinier Cléopâtre x Poncirus) assure une bonne discrimination entre origine zygotique et somatique (> 96 p. 100) dans le cas des ovules allofécondés. En revanche ce taux de discrimination n'atteint que 87 p. 100 pour les ovules de limettier et de Poncirus en autofécondation (3 loci hétérozygotes pour chacune de ces variétés). La qualité des zymogrammes étant suffisante pour pouvoir juger l'intensité relative des différentes bandes, la discrimination entre l'albumen et d'autres tissus est réalisée sans ambiguïté. Il est à noter que cette discrimination reste satisfaisante même si

TABLEAU 2 - Génotypes des variétés étudiées pour les 5 loci enzymatiques.

	PGI	MDH2	MDH3	ICD	GOT
oranger	2/3	3/3	2/2	2/3	1/1
bigaradier	2/4	3/3	2/2	3/3	1/1
mandarinier	3/4	3/3	2/2	3/3	1/1
limettier	2/2	1/3	1/2	1/3	2/2
citronnier	2/4	1/3	2/2	1/3	1/2
Poncirus	2/3	1/1	1/2	4/4	2/3
Cléo. x Ponc.	2/3	1/3	2/2	3/4	1/2

TABLEAU 3 - Potentiel de discrimination entre les différentes origines tissulaires, à l'aide des quatre systèmes analysés. (en pourcentage)

	non fécondés	fécondés				
	G/S	Z/S	Z/A1	Z/A2	A1/S	A2/S
oranger	100	96	100	87	100	87
bigaradier	100	96	100	75	100	94
mandarinier	100	96	100	75	100	94
limettier	100	87	100	87	100	0
citronnier	100	98	100	98	100	94
Ponricus	100	87	100	87	100	0

A : Albumen A1 prise en compte de l'intensité relative des bandes
A2 prise en compte de la présence/absence de bandes
G : Gamétique
S : Somatique
Z : Zygotique

l'on ne tient compte que de la présence/absence des bandes ; ce à l'exception des 2 autofécondations pour lesquelles on ne peut alors distinguer les tissus de l'albumen des tissus somatiques.

- Origine des vitroplants.

Les profils enzymatiques observés pour les vitroplants sont identiques à ceux des plantes adultes, à l'exception des MDH pour lesquels le locus MDH1 est actif dans certains vitroplants. Ce locus non exprimé chez les plantes adultes avait été observé précédemment dans le pollen (OLLITRAULT non publié).

Le tableau 4 synthétise les origines des 123 vitroplants analysés. Il apparaît que les 50 vitroplants obtenus par culture d'ovules non fécondés étaient d'origine somatique. Parmi les 73 obtenus à partir d'ovules fécondés, 6 ont été identifiés comme étant d'origine zygotique (photo 6). Un de ces vitroplants zygotiques, provenant d'un ovule de bigaradier, présentait par ailleurs le caractère trifolié du pa-

TABLEAU 4 - Origine tissulaire des vitroplants régénérés par culture d'ovules.

	non fécondés				fécondés						Total S/ total plantes
	E.D.		E.I.		E.D.			E.I.			
	G	S	G	S	S	Z	A	S	Z	A	
oranger	0	11	0	5	3	0	0	3	0	0	22/22
bigaradier	0	9	-	-	8	2	0	-	-	-	17/19
mandarinier	0	5	0	4	5	3	0	6	0	0	20/23
limettier	0	7	-	-	11	0	0	-	-	-	18/18
citronnier	0	7	0	2	9	0	0	3	0	0	21/21
Poncirus	-	-	-	-	19	1	0	-	-	-	19/20
Total	0	39	0	11	55	6	0	12	0	0	117/123
Total S/ total plantes	50/50				67/73						

A : albumen
G : gamétique
S : somatique
Z : zygotique
E.D. : embryogenèse directe
E.I. : embryogenèse indirecte (passage par cal)

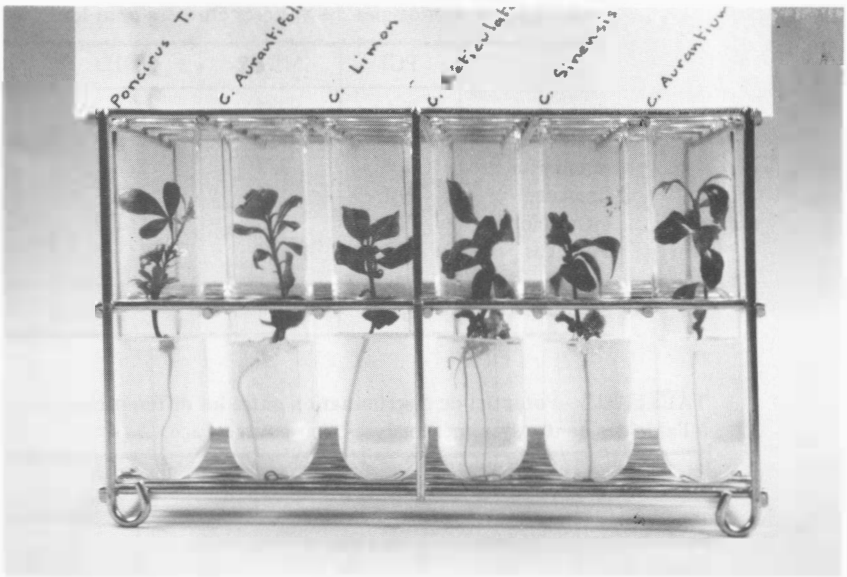

Photo 5
Vitroplants de 6 espèces d'agrumes.

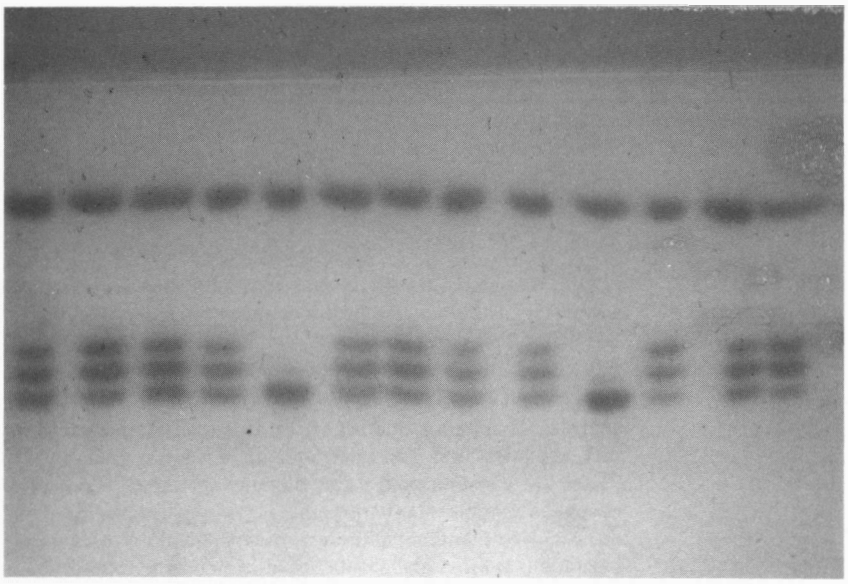

Photo 6
Etude de l'origine des vitroplants par électrophorèse.

rent mâle Cléopâtre x *Poncirus* ; ce caractère est dominant et à l'état hétérozygote chez ce géniteur. Les autres vitroplants provenaient de tissus somatiques. Notons enfin, que tous les plants zygotiques obtenus dans cette expérimentation sont issus d'embryogenèse directe.

DISCUSSION

Les potentialités callogène et embryogène apparaissent fortement différentes suivant les génotypes, et dans une moindre mesure en fonction du stade de prélèvement. Cette différence de réactivité entre cultivars avait déjà été constatée par de nombreux auteurs (KOCHBA *et al.*, 1972 ; MOORE, 1985 ; GMITTER et MOORE, 1986). Elle est souvent corrélée aux niveaux de polyembryonie *in vivo* des cultivars (MOORE, 1985) et pourrait s'expliquer par des balances hormonales endogènes différentes. Ainsi, TISSERAT et MURASHIGE (1977 a) ont montré que la présence d'ovules de cédratier (monoembryonné), inhibait l'embryogenèse somatique des cals de mandarinier Ponkan (polyembryonné), placés dans le même récipient de culture. Ces mêmes auteurs (1977 b) démontraient que les ovules de cédratier contenaient des niveaux d'AIA, d'acide abcissique et de gibbérelline endogènes nettement plus élevés que ceux du mandarinier Ponkan. Ces différents niveaux d'hormones endogènes pourraient également expliquer la diversité des réponses à l'apport d'hormones exogènes (GMITTER et MOORE, 1986).

La fécondation ne paraît pas nécessaire à la prolifération d'embryons *in vitro*, à partir d'ovules de variétés polyembryonnées. Ceci confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs au stade anthèse (KOBAYASHI *et al.*, 1982), au stade jeune fruit (BUTTON et BORMAN, 1971 ; KOCHBA *et al.*, 1972 ...) ou au stade fruit mature (STARRANTINO et RUSSO, 1980). Selon SHARP *et al.* (1980) et WAKANA et UEMOTO (1987), l'absence d'effet stimulateur de la fécondation, ainsi que l'expression de l'embryogenèse adventive en l'absence de régulateur de croissance exogène, témoignent de l'existence de cellules préembryogènes dans l'ovule. Les embryons somatiques se dé-

velopperaient directement, tant *in vivo* qu'*in vitro*, à partir de ces cellules prédéterminées avant l'anthèse. Ces cellules ont été observées au niveau histologique par KOBAYASHI *et al.* (1981). *In vivo*, la présence d'albumen est nécessaire au développement complet des embryons (ESEN et SOOST, 1977 a), tandis que le milieu de culture assure la bonne nutrition des embryons *in vitro*.

La kinétine paraît défavorable à l'embryogenèse tandis qu'elle favorise l'induction de la callogenèse. De tels résultats avaient précédemment été mis en évidence par TISSERAT et MURASHIGE (1977 b) et MOORE (1985). De même, la kinétine inhibe l'embryogenèse au sein des cals nucellaires, KOCHBA et SPIEGEL ROY (1977). Les analyses enzymatiques montrent que les cals compacts verts, obtenus à partir des ovules de citronnier, sont d'origine somatique. Ils sont certainement issus des tissus tégumentaires, comme ceux observés au niveau histologique par KOBAYASHI (1987). L'induction de cal friable, à forte capacité embryogène, n'a pas pu être obtenue pour les citronniers, les limettiers et les Poncirus. Ces résultats confirment la nécessité de mettre au point des milieux d'induction spécifiques pour chaque variété ou groupe de variétés. MOORE *et al.* (1988), par exemple, ont obtenu des cals embryogènes de limettier «Key» par l'adjonction de chloramphénicol (0,1 à 1 mg/l). Des cals friables embryogènes de citronnier ont pu être obtenus sur des milieux contenant du 2,4-D, toutefois ce traitement a entraîné l'apparition de variants (VARDI *et al.*, 1982).

Pour les ovules non fécondés, la discrimination entre plants d'origine gamétique et somatique, nécessite l'étude d'un locus hétérozygote. Compte tenu de l'hétérozygotie relativement élevée des variétés d'agrumes (OLLITRAULT, 1990), un tel locus peut généralement être observé grâce aux systèmes enzymatiques standards. Toutefois, pour certaines variétés de mandarinier très homozygotes, cette technique sera inopérante. Dans la présente étude tous les vitroplants obtenus à partir d'ovules non fécondés sont d'origine somatique. La castration et l'ensachage des fleurs, pourraient donc être une technique simple et efficace pour s'assurer de l'origine somatique des cals induits par culture d'ovules.

Pour les ovules en fécondation croisée, les génotypes des différents parents femelles et du parent mâle, n'ont pas permis une discrimination totale entre les origines somatique et zygotique. L'analyse enzymatique reste toutefois très performante puisque plus de 95 p. 100 des plants zygotiques sont identifiés. Pour les deux génotypes en autofécondation, les résultats sont moins probants. En effet, 13 p. 100 des plants zygotiques peuvent passer inaperçus. L'analyse de systèmes enzymatiques supplémentaires devrait toutefois permettre d'augmenter les taux de discrimination. Six plants d'origine zygotique ont été mis en évidence parmi les 73 vitroplants issus d'ovules fécondés. La proportion de plants zygotiques est particulièrement élevée pour les vitroplants de mandarinier obtenus par embryogenèse directe (3/8). Moyennant une détermination du stade de prélèvement et des conditions de culture optimales, la culture d'ovules fécondés pourrait donc être utilisée pour obtenir des plants hybrides entre espèces polyembryonnées.

Dans cette expérimentation nous n'avons pas mis en évidence de callogenèse friable à partir de tissus zygotiques. Toutefois, peu de vitroplants obtenus par embryogenèse indirecte ont été étudiés et l'on ne peut donc pas conclure à l'absence systématique de callogenèse primaire d'origine zygotique. De plus la possibilité d'une embryogenèse zygotique directe et d'une callogenèse secondaire à partir de l'embryon (HIDAKA, 1990) rendent nécessaire une vérification de l'origine des cals friables. Celle-ci peut être réalisée, suivant le même principe que pour les vitroplants puisqu'il est possible d'étudier les isozymes directement sur le cal (BEN HAYYIM *et al.*, 1982, et nos résultats non publiés).

Les isozymes sont performants pour mettre en évidence les remaniements du génome associés à la méïose et à la fécondation. Dans le cas présent ils nous ont ainsi permis de distinguer les tissus somatiques, gamétiques, zygotiques ainsi que les tissus de l'albumen. En revanche l'analyse du polymorphisme enzymatique n'est pas adaptée à la détection de mutations ponctuelles ou d'éventuelles variations somaclonales. De même, les polyploïdisations spontanées de tissus embryogènes nucellaires, qui peuvent se produire à des fréquences non négligeables (ESEN et SOOST, 1977 b), passent inaperçues lors des études enzymatiques. Seules des observations cytogénétiques ou la cytométrie en flux (OLLITRAULT et MICHAUX-FERRIERE, 1992) peuvent permettre de détecter ces variations de niveaux de ploïdie. Ces observations devront donc être associées aux analyses enzymatiques afin de s'assurer au mieux, de la conformité génotypique du matériel travaillé.

CONCLUSION

L'embryogenèse est aisément obtenue par culture d'ovules, fécondés ou non, de variétés polyembryonnées. En revanche, certaines variétés s'avèrent récalcitrantes à l'établissement de souche de cals friables embryogènes d'origine somatique. Ces cals constituant le centre de nombreux programmes d'amélioration il apparaît nécessaire de mettre au point des milieux d'induction spécifiques à chaque variété ou groupe de variétés. Et ce, si possible, à l'aide de «techniques douces» n'induisant pas de variations génétique ou somaclonale.

La mise en évidence d'embryogenèse zygotique *in vitro* à partir d'ovules fécondés impose une vérification de l'origine tissulaire des cals, lors de l'établissement des souches destinées aux programmes d'amélioration ou de multiplication. L'électrophorèse enzymatique s'est avérée performante, dans la majorité des cas, pour distinguer les différentes origines tissulaires. Elle pourra toutefois, compte tenu des possibilités de polyploïdisation spontanée des tissus nucellaires, être complétée utilement par la cytométrie en flux, afin de contrôler le niveau de ploïdie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BEN HAYYIM (G.), SHANI (A.) and VARDI (A.). 1982.
Evaluation of isozyme systems in *Citrus* to facilitate identification of fusion product.
The. Appl. Genet., 64, 1-5.

BITTERS (W.P.), MURASHIGE (T.), RANGAN (T.S.) and NAUER (E.). 1970.
Investigations on established virus free citrus plants through tissue culture.
Calif. Citrus Nursery-men's Soc., 9, 27-30.

BUTTON (J.) and BORMAN (C.H.). 1971.
Development of nucellar plants from unpollinated and unfertilized ovules of the Washington navel orange *in vitro.*
J. S. Afric. Bot., 37, 127-134.

ESEN (A.) and SOOST (R.K.). 1977 a.
Adventive embryogenesis in *Citrus* **and its relation to pollination and fertilization.**
Amer. J. Bot., 64, 607-614.

ESEN (A.) and SOOST (R.K.). 1977 b.
Relation of unexpected polyploids to diploids megametophytes and embryo : endosperm ploidy ratio in *Citrus.*
in : *«I°congreso mundial de citricultura», O. Carpena ed., Murcia Valencia*, vol. 2, 53-63.

GMITTER (F.G.) and MOORE (G.A.). 1986.
Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus* **: Embryo production, germination, and plant survival.**
Plant Cell Tissue and Organ Culture, 6, 139-147.

GMITTER (F.G.), LING (X.B.) and DENG (X.X.). 1990.
Induction of triploid *Citrus* **plants from endosperm calli** *in vitro.*
Theor. Appl. Genet., 80, 785-790.

GROSSER (J.W.), GMITTER (F.G.) and CHANDLER (J.L.). 1988.
Intergeneric somatic hybrid plants of *Citrus sinensis* **cv. Hamlin and** *Poncirus trifoliata* **cv. Flying dragon.**
Plant Cell Reports, 7, 5-8.

HIDAKA (T.). 1990.
Citrus tissue culture : a «shuttle callus system» and its application.
Proc. of the 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation, FAO-UNDP RAS/86/022 regional project. B. Aubert, S. Tontyaporn and D. Buangsuwon (Eds), 48-56.

KOBAYASHI (S.). 1987.
Citrus protoplast technology : protoplast culture and somatic cell fusion.
in : *«The breeding of horticultural crops», FFTC Book Serie* n° 35, 123-135.

KOBAYASHI (S.), IKEDA (I.) and NAKATANI (M.). 1981.
Role of the primordium cell in nucellar embryogenesis in *Citrus.*
In : *Proc. Int. Soc. Citriculture 1981*, vol. 1, 44-48.

KOBAYASHI (S.), IKEDA (I.) and NAKATANI (N.). 1982.
Studies on nucellar embryogenesis in Citrus.
III - On the differences in ability to form embryoid in *in vitro* **culture of ovules from poly- and mono-embryonic cultivars.**
Bull. Fruit Tree Res. Sta. E (Japan), 4, 21-27 (in japanese).

KOCHBA (J.), SPIEGEL-ROY (P.) and SAFRAN (Hannah). 1972.
Adventive plants from ovules and nucelli in *Citrus.*
Planta (Berl.), 106, 237-245.

KOCHBA (J.) and SPIEGEL-ROY (P.). 1973.
Effect of culture media on embryoid formation from ovular callus of Shamouti orange (*Citrus sinensis***).**
Z. Pflanzenzuchtg., 69, 156-162.

KOCHBA (J.) and SPIEGEL-ROY (P.). 1977.
The effect of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the «Shamouti» orange *(Citrus sinensis).*
Z. Pflanzenphysiol., 81, 283-288.

MITRA (G.C.) and CHATURVEDI (H.C.). 1972.
Embryoids and complete plants from unpollinated ovaries and from ovules of *in vivo*-**grown emasculated flowers buds of** *Citrus* **sp.**
Bull. Torrey Bot. Club., 99, 184-189

MOORE (G.A.). 1985.
Factors affecting *in vitro* **embryogenesis from undeveloped ovules of mature** *Citrus* **fruit.**
J. Amer. Soc. Hort. Sci., 110 (1), 66-70.

MOORE (G.A.), MILLER (M.J.) and CLINE (Kenneth). 1988.
The effects of low levels of chloramphenicol and methotrexate on somatic embryogenesis in *Citrus.*
In vitro Cellular and Developmental Biology, 24 (12), 1205-1208.

MURASHIGE (T.) and TUCKER (D.P.H.). 1969.
Growth factor requirements of citrus tissue culture.
Proceeding first international citrus symposium, vol. 3.

OLLITRAULT (P.). 1990.
Isozymes and RFLP's as genetic markers in citrus selection.
Proc. of the 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation, FAO-UNDP RAS/86/022 regional project. B. Aubert, S. Tontyaporn and D. Buangsuwon (Eds), 57-68.

OLLITRAULT (P.) et FAURE (X.). 1992.
Citrus rootstocks characterization with bark and leaf isozymes ; Application to screen zygotic and nucellar trees.
VII Int. Citrus Con. Acireale (Italy), Marsh 8-23.

OLLITRAULT (P.) et MICHAUX-FERRIERE (Nicole). 1992.
Etude critique de la technique de cytométrie en flux appliquée à l'amélioration des plantes. Résultats obtenus pour quelques agrumes.
Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 195-203.

RANGAN (T.S.), MURASHIGE (T.) and BITTERS (W.P.). 1969.
In vitro **studies of zygotic and nucellar embryogenesis in** *Citrus.*
In : *Chapman (ed) Proc. 1st Int. Citrus Symp. Riverside, Univ. California*, vol. 1, 225-229.

SHARP (W.R.), SONDAHL (M.R.), CALDAS (L.S.) and MARAFFA (S.B.). 1980.
The physiology of *in vitro* **asexual embryogenesis.**
In : *J. Janick (ed) Horticultural reviews, AVI Publishing, Westport, CT.*, vol. 2, 268-310.

STARRANTINO (A.) and RUSSO (F.). 1980.
Seedlings from undeveloped ovules ripe fruits of polyembryonic citrus cultivars.
Hort. Science, 15 (3), 296-297.

TISSERAT and MURASHIGE (T.). 1977 a.
Probable identity of substances in citrus that repress asexual embryogenesis.
In vitro, 13, 785-789.

TISSERAT and MURASHIGE (T.). 1977 b.
Repression of asexual embryogenesis *in vitro* **by some plant growth regulators.**
In vitro, 13, 799-805.

TORRES (A.M.), SOOST (R.K.) and DIEDENHOFEN (U.). 1978.
Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus.*
Amer. J. Bot., 65, 8, 869-881.

VARDI (A.), SPIEGEL-ROY (P.) and GALUN (E.). 1982.
Plant regeneration from *Citrus* **protoplasts : variability in methodological requirements among cultivars and species.**
Theor. Appl. Genet., 62, 171-176.

WAKANA (S.) and UEMOTO (S.). 1987.
Adventive embryogenesis in *Citrus.*
I - The occurence of adventive embryos without pollination or fertilization.
Amer. J. Bot., 74, 517-530.

WAKANA (S.) and UEMOTO (S.). 1988.
Adventive embryogenesis in *Citrus.*
II - Postfertilization development.
Amer. J. Bot., 75 (7), 1033-1047.

INDUCCION DE CALLOS EMBRIOGENICOS DE CITRICOS POR CULTIVO DE OVULOS : DETERMINACION ISOENZIMATICA DE LOS TEJIDOS DE ORIGEN DE LOS EMBRIONES.

P. OLLITRAULT, Frédérique OLLITRAULT y Cécile CABASSON.

Fruits, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 204-212.

RESUMEN - Los callos embriogenicos de cítricos ofrecen muchas perspectivas para la creación varietal y la propagación de los portainjertos. Ovulos fecundados y sin fecundar de seis especies de Citrus (naranjo amargo, naranjo, mandarino, limonero, limero y pomelo) y de Poncirus Pomeroy, muestreados durante 5 semanas después de la antesis y puestos en cultivo sobre dos medios de inducción (MT sin hormona, MT + Kinetina). La respuesta de los ovulos es óptima 3 semanas después de la antesis. Se obtuvieron embriones para todas las variedades. En cambio, ningún calli friable embriogenico fué inducido a partir de los ovulos de limonero, de limero y de Poncirus. El estudio del polimorfismo de cuatro sistemas enzimáticos ha permitido el análisis de los tejidos de origen de 123 vitroplantas. No se observo ningún embrion originario del albumen o de tejidos gamétiooos. Que la embriogenesis sea directa o no, la mayoría de las vitroplantas obtenidas fueron de origen somático. Sin embargo algunas vitroplantas zigóticas se obtuvieron por embriogenesis directa. Una verificación isoenzimática de los tejidos de origen resulta por lo tanto necesario en el momento de establecer las cepas de callos embriogénicos. Este será suficiente para asegurarse del origen somático del callo si los ovulos han sido previamente fecundados por fecundación cruzada. En el caso de fecundaciones no controladas, la eficacia de esta técnica dependerá entonces de la heterozigosis del cultivar.