



UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE
EN RECHERCHE AGRONOMIQUE
POUR LE DEVELOPPEMENT
UMR CNRS 6134 (SPE)
Faculté des Sciences et Techniques



Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE CORSE
Mention : Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement par

Mourad Kamiri

le 22 février 2011

Biologie de la reproduction des hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes ; implication sur la structure génétique des populations d'hybrides générées dans les croisements diploïdes x tétraploïdes

Jury

Rapporteurs :

M Luis Navarro, Directeur de recherches, IVIA de Valencia - Espagne
M Abdelaziz Hmyène, Professeur, Université Hassan II Mohammedia - Maroc

Examineurs :

Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse
M Felix Tomi, Professeur, Université de Corse

Directeur :

M Patrick Ollitrault, Chercheur HDR, CIRAD

Co-Directeur :

M Yann Froelicher, Chercheur HDR, CIRAD

1°) RESUME EN LANGUE FRANÇAISE

Biologie de la reproduction des hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes ; implication sur la structure génétique des populations d'hybrides générées dans les croisements diploïdes x tétraploïdes

Dans de nombreux bassins de production d'agrumes, la diversification des petits agrumes de type mandarinier sans pépins est au cœur des stratégies de segmentation du marché. Cette diversification variétale s'appuie largement sur la création d'hybrides triploïdes. En effet, grâce à la parthénocarpie des agrumes, la stérilité engendrée par la triploïdie n'affecte pas la fruidibondité et permet d'obtenir des fruits sans pépins.

Le croisement des diploïdes et des tétraploïdes est la méthode qui devrait en théorie être la plus efficace pour produire des triploïdes. En effet, 100 % de la descendance devrait être triploïde. De plus, cette méthode permet de maximiser l'hétérozygotie lorsque ces tétraploïdes ont une ségrégation tétrasomique ou la réduire lorsque la ségrégation est disomique.

Afin d'y parvenir, le CIRAD a mis en place un programme d'hybridation somatique permettant d'augmenter le nombre de parents tétraploïdes disponibles et ainsi contribuer à une meilleure définition des stratégies d'amélioration des agrumes triploïdes. Dans le but d'avoir une meilleure prévision du phénotype des hybrides polyploïdes en fonction de celui de leurs géniteurs, l'étude de la biologie de la reproduction de ces hybrides somatiques s'est imposée.

Ce travail a pour objectif 1/ de comprendre la transmission du système de reproduction des hybrides somatiques d'agrumes en fonction de leurs parents diploïdes, 2/ de mieux prévoir la structure génétique des hybrides triploïdes lors des croisements $2x \times 4x$, 3/ de comprendre l'origine génétique des variations de ploïdie observées dans les croisements entre diploïde et tétraploïde.

Ce travail représente la première étude sur la transmission du système de reproduction des hybrides somatiques d'agrumes. L'ensemble des hybrides ont montré une fertilité intermédiaire ou identique à celle du parent le moins fertile. Cependant, une diminution du degré de polyembryonie et une augmentation du pourcentage d'embryons d'origine zygotique ont été observées chez certains hybrides somatiques.

L'étude de la ségrégation allélique chez les hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes a été réalisée sur un hybride interspécifique et un intergénérique. L'étude cytogénétique chez l'hybride somatique interspécifique entre mandarinier commun (*Citrus reticulata* Blanco) et Citronnier Eureka (*Citrus limon* (L.) Burm. a révélé la formation d'une majorité de bivalents (76%) avec une présence de mono et tétravalents (4% et 11% respectivement). L'étude de la ségrégation allélique a été réalisée sur deux populations triploïdes issue du croisement entre le pamplemoussier Chandler (femelle) et l'hybride somatique interspécifique entre mandarinier et Citronnier et entre le pamplemoussier Chandler et l'hybride somatique intergénérique (*Citrus reticulata* Blanco) + *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Au niveau interspécifique, l'étude moléculaire à l'aide de dix sept marqueurs microsatellites a mis en évidence une ségrégation tétrasomique et intermédiaire chez cet hybride somatique. Chez l'hybride intergénérique, il ressort que la ségrégation est de type intermédiaire à tendance disomique. Enfin, les descendances issues de trois croisements de type $2x \times 4x$ ont présenté en plus des triploïdes des individus diploïdes et tétraploïdes. L'étude moléculaire a révélé que les individus tétraploïdes sont issus de la fécondation entre un gamète femelle non réduit et un gamète mâle diploïde tandis que les individus diploïdes sont obtenus suite à la fécondation de 2 gamètes haploïdes dont un provient de l'hybride somatique tétraploïde, ou peuvent être apomictiques.

Mots clés : Agrumes, hybridation somatique, polyploïdie, ségrégation allélique, SSR, méiose, apomixie

2°) Abstract in English

Biology of reproduction in Citrus tetraploid somatic hybrids : implications in progenies obtained in diploid x tetraploid crosses

Citrus somatic hybridization via protoplast fusion has become an integral part of citrus variety improvement programs worldwide. Applications of somatic hybridization to citrus scion improvement include the production of quality tetraploid breeding parents that can be used in interploid crosses to generate seedless triploids.

One way to obtain triploids is by crossing diploids and tetraploids. Indeed, this method should give birth to a complete triploid progeny. However, only few natural citrus tetraploids are available. CIRAD developed a Somatic hybridization program that has resulted in a great diversification of the tetraploid *gene* pool available for sexual hybridization with diploid cultivars. In order to assess progeny genotypes, obtained by interploidal crosses involving citrus somatic hybrids depending on fusion parents, the study of citrus somatic hybrids reproduction biology was necessary.

The objective of this thesis is 1/ to determine the impact of somatic hybridization on the somatic hybrids phenotype especially on reproduction characteristics (Pollen fertility and Apomixis/polyembryony) 2/ to analyze the allelic inheritance in citrus intergeneric and interspecific somatic hybrids, and finally 3/ to establish the origin of ploidy variation in interploidal progenies involving citrus tetraploid somatic hybrids.

Analysis of reproduction characteristics in citrus somatic hybrids showed intermediate pollen characteristics to their fusion parents or identical to the lowest fertile parent. Concerning apomixis/polyembryony transmission, when compared to their diploid parents, all studied somatic hybrids were apomictic and polyembryonic. However, significant raise of zygotic rates in some were observed compared to their diploid parents. Moreover, polyembryony rates decreased significantly.

Allelic inheritance studies were performed for an interspecific and an intergeneric somatic hybrids. Cytogenetic analysis of meiosis in a citrus interspecific somatic hybrid, between Willowleaf mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and Eureka lemon (*Citrus limon* (L.) Burm, displayed 11% of tetravalents and 76% of bivalents. Inheritance of this tetraploid hybrid was analyzed by genotyping the triploid progeny derived from a cross between a diploid pummelo and this tetraploid somatic hybrid. Markers segregation was largely compatible with tetrasomic and intermediate inheritance, with preferential pairing of homeologous chromosomes. However at the intergeneric level, obtained results support intermediate inheritance in a Citrus intergeneric somatic hybrid with occurrence of preferential pairing of homologous chromosomes.

Molecular analysis of interploidal crosses progeny implying citrus somatic hybrids revealed different ploidy levels and that tetraploids were issued from a diploid male and an unreduced female gamete. However, diploids were issued from a haploid female and a viable haploid male gamete coming from the tetraploid somatic hybrid.

Keywords: *Citrus*, polyploids, somatic hybridization, allelic inheritance, SSR, meiosis, apomixis