

Les agrumes

Patrick Ollitrault, Camille Jacquemond,
Cécile Dubois, François Luro

Les agrumes constituent la première production fruitière mondiale avec 89,6 millions de tonnes, dont près de 60 millions de tonnes d'oranges en 1996 (FAO, 1997). Le volume de fruits transformés est en augmentation : les jus d'orange concentrés et congelés absorbent une grande partie de la production des Etats-Unis et du Brésil.

Domestiqués dans le Sud-Est asiatique il y a plusieurs millénaires, les agrumes ont été diffusés dans le monde entier (figure 1). Le cédratier a été la première espèce cultivée dans le bassin méditerranéen, quelques siècles avant notre ère, tandis que les autres espèces n'y ont été introduites qu'au cours du deuxième millénaire. Les agrumes ont gagné l'Amérique à la suite de la découverte du Nouveau Monde au xv^e siècle. L'aire agrumicole est aujourd'hui très étendue, elle se situe approximativement entre 40° de latitude nord et de latitude sud.

La culture des agrumes est confrontée à des contraintes biotiques et abiotiques croissantes dans les principales régions de production. La *tristeza* — maladie de dégénérescence provoquée par le *citrus tristeza virus* —, *Phytophthora* sp. et les nématodes se rencontrent aujourd'hui dans la quasi-totalité de l'aire de culture. D'autres contraintes ont, en revanche, un caractère régional : le froid et le *blight* — maladie de dégénérescence d'origine encore indéterminée —, aux Etats-Unis, la *citrus variegated chlorosis* due à *Xilela fastidiosa*, au Brésil,

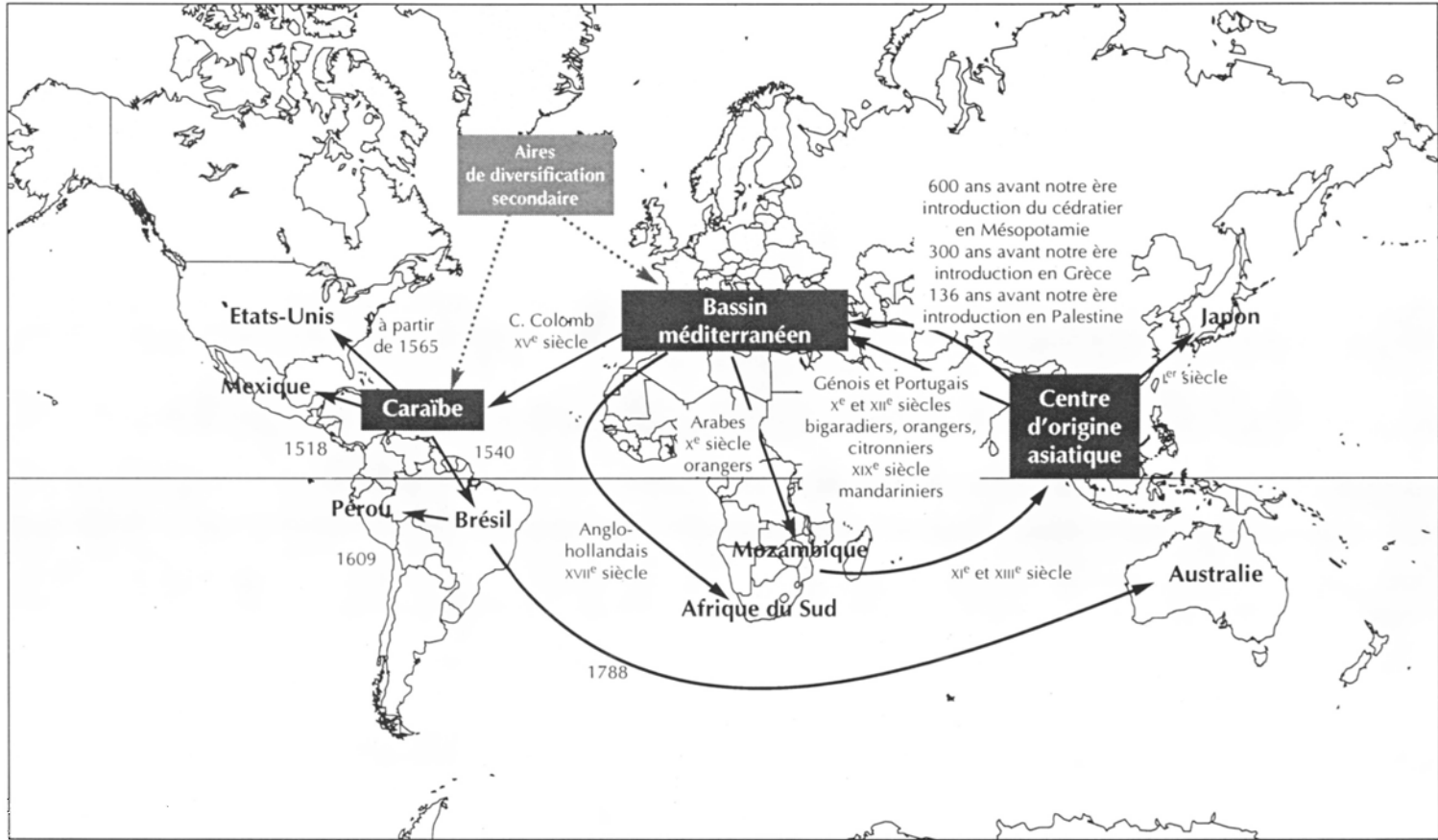


Figure 1. Région d'origine, dispersion et zones de diversification des agrumes cultivés.

la cercosporiose provoquée par *Phaeoramularia angolensis*, en Afrique, le *greening*, ou *citrus huanglongbing*, en Asie. Parmi les contraintes abiotiques, la salinité et les sols calcaires sont les problèmes majeurs du bassin méditerranéen. La pratique quasi généralisée de la culture de plants greffés permet, dans une certaine mesure, de répondre aux contraintes liées aux sols (calcaire, salinité, parasitisme tellurique) et à la *tristeza* grâce aux porte-greffe. La sélection des scions repose quant à elle sur des aspects qualitatifs et, dans certains pays, sur des caractères de tolérance à la *citrus variegated chlorosis* ou à la cercosporiose (OLLITRAULT et LURO, 1997).

La botanique et les ressources génétiques

La botanique et la taxonomie

L'apomixie partielle par embryogenèse nucellaire, associée à une large compatibilité sexuelle, a conduit à la production de populations clonales d'hybrides interspécifiques, qui ont souvent été assimilées à de nouvelles espèces par les taxonomistes. Les classifications botaniques sont ainsi généralement complexes. TANAKA (1961) identifie 156 espèces tandis que SWINGLE et REECE (1967) n'en distinguent que 16. La correspondance entre ces deux classifications et les noms communs est donnée dans le tableau 1 pour les taxons étudiés dans ce chapitre. Chez tous les agrumes et genres apparentés, le nombre de chromosomes de base (n) est égal à 9 (KRUG, 1943). La quasi-totalité des agrumes est diploïde et seuls quelques polyploïdes naturels ont été identifiés, comme *Fortunella hindsii* ou la lime Tahiti.

Les ressources génétiques

De nombreuses collections d'agrumes existent à travers le monde. Elles ont deux vocations, souvent divergentes quant au choix du matériel végétal à conserver : préserver à long terme la diversité des agrumes et des genres apparentés ; constituer des parcs à bois pour fournir des greffons de variétés commerciales. La collection de l'Okitsu Branch (Fruit Tree Research Station), au Japon, est la plus importante pour le matériel cultivé des zones d'origine, tandis que le conservatoire de l'université de Malaisie est remarquable par sa collection d'*Aurantioideae* du Sud-Est asiatique. Les collections de l'USDA (United States Department of Agriculture) et de l'université de Californie, aux Etats-Unis, celles de l'IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias), en Espagne, et de l'université d'Adana, en Turquie, renferment certaines rutacées apparentées aux agrumes mais sont surtout régulièrement alimentées par

Tableau 1. Accessions de *Citrus* analysées et caractéristiques génétiques.

Code	Cultivar	Nom d'espèce		Marqueur morpho.	Taille du génome (pg/2C)	Génotype enzymatique											
		SWINGLE et REECE (1967)	TANAKA (1961)			ADH-1 AAT	IDH LAP	MDH-1 MDH-2	PGI PGM-1	PGM-2 PER	SKDH						
• Mandariniers (M)																	
Mks	King of Siam	<i>reticulata hybrid</i>	<i>nobilis</i>	1	1	0,760	22	11	33	44	33	22	33	34	12	12	33
Msw*	Satsuma Wase	<i>reticulata</i>	<i>unshiu</i>	1	1	0,737	22	11	33	34	33	22	23	33	22	22	33
Mso	Satsuma Owari	<i>reticulata</i>	<i>unshiu</i>	1	1	—											
Mda	Dancy	<i>reticulata</i>	<i>tangerina</i>	1	1	0,736	22	11	33	44	33	22	33	33	22	12	33
Mte	Temple	<i>reticulata hybrid</i>	<i>temple</i>	1	1	0,748	22	11	33	24	33	22	23	23	22	22	33
Mcl	Cléopâtre	<i>reticulata</i>	<i>reshni</i>	1	1	0,733	22	11	33	44	33	22	33	22	22	22	33
Mpo	Ponkan	<i>reticulata</i>	<i>reticulata</i>	1	1	0,744	22	11	33	44	33	22	33	33	22	11	22
Mco	Commun	<i>reticulata</i>	<i>deliciosa</i>	1	1	0,730	22	11	33	45	33	22	34	23	22	12	23
M63	Clémentinier SRA63	<i>reticulata</i>	<i>clementina</i>	1	1	0,750	22	11	23	24	33	22	24	33	22	22	33
Mmu	Murcott	<i>reticulata hybrid</i>		1	1	0,746	22	11	33	44	33	22	33	33	22	22	33
• Pamplémoussières (P)																	
Pme	Menara	<i>grandis</i>	sp.	1	1	0,751	22	12	33	22	33	22	22	13	11	12	23
Prk	Reinking	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	1	1	0,774	22	22	33	45	33	22	22	44	11	11	12
Pkp	Kao Pan	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	1	1	0,767	22	12	23	35	33	22	22	13	11	11	12
Psn	Sunshine	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	1	1	0,794	22	22	23	25	33	12	22	33	11	11	11
Ppi	Pink	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	1	1	0,779	22	11	33	55	33	22	22	13	11	11	11
Psp	Sans pépins	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	1	1	0,787	22	12	33	25	33	22	23	11	11	11	12
Pin	Inde	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	1	1	0,787	22	22	22	55	33	22	22	33	11	11	12
Pah	Tahiti	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	0	1	—	22	12	33	25	33	22	22	11	11	11	11
Pph	Philippines	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	0	1	—	22	22	33	55	33	22	22	11	11	11	11
Psu	Surinam	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	0	1	—	22	12	23	35	33	22	22	13	11	11	11
Pei	Eingedi	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	1	0	0,763	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pch	Chandler	<i>grandis</i>	<i>maxima</i>	1	0	0,764	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
• Limettiers (L)																	
Lbs	Brazil Sweet	<i>aurantifolia</i>	<i>limettioides</i>	1	1	0,756	22	12	33	36	13	22	23	22	12	11	12
Lga	Gallet	<i>aurantifolia</i>	<i>aurantifolia</i>	1	1	0,787	12	12	13	36	13	12	22	22	22	11	12
Lta	Tahiti	<i>aurantifolia</i>	<i>latifolia</i>	1	1	1,170											
Lme	Mexicain	<i>aurantifolia</i>	<i>aurantifolia</i>	1	1	0,779											

Tableau 1. Suite.

Code	Cultivar	Nom d'espèce		Taille du génome (pg/2C)		Génotype enzymatique											
		SWINGLE et REECE (1967)	TANAKA (1961)			Marqueur morpho. iso.		ADH-1 AAT		IDH	MDH-1 LAP		MDH-2	PGI PGM-1		PGM-2 PER	SKDH
Lel	Elkseur	<i>aurantifolia</i>	<i>latifolia</i>	1	1	1,170											
Lbe	Bears	<i>aurantifolia</i>	<i>latifolia</i>	1	1	1,170	22	22	13	36	13	12	22	23	12	11	22
Lca	Calédonie	<i>aurantifolia</i>	<i>aurantifolia</i>	1	1	0,784											
Lki	Kirk	<i>aurantifolia</i>	<i>aurantifolia</i>	1	1	0,779											
Lra	Rangpur	<i>aurantifolia</i>	<i>limonia</i>	1	1	0,772	22	12	13	36	13	22	23	22	22	11	13
Lka	Kanghzi	<i>aurantifolia</i>	<i>aurantifolia</i>	0	1	—	22	22	12	36	13	22	22	22	12	11	22
Lsr	IAC SRA618	<i>aurantifolia</i>	<i>aurantifolia</i>	1	0	1,170	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
• Citronniers (C)																	
Cme	Meyer	<i>limon</i>	<i>meyeri</i>	1	1	0,772	22	12	23	46	13	22	23	23	12	12	12
Cfi	Fino	<i>limon</i>	<i>limon</i>	1	1	0,784											
Cve	Verna	<i>limon</i>	<i>limon</i>	1	1	—											
Cad	Adamapoulos	<i>limon</i>	<i>limon</i>	1	1	0,769											
Cdx	Doux	<i>limon</i>	<i>limon</i>	1	1	0,778											
Cli	Lisbon	<i>limon</i>	<i>limon</i>	1	1	0,786	22	12	13	46	13	22	24	23	12	12	12
Cvi	Villafranca	<i>limon</i>	<i>limon</i>	1	1	0,776											
Cmo	Monachello	<i>limon</i>	<i>limon</i>	1	1	0,787											
Ceu	Euréka	<i>limon</i>	<i>limon</i>	1	1	0,777											
Clu	Lunari	<i>limon</i>	<i>limon</i>	0	1	—											
Cst	Santa Teresa	<i>limon</i>	<i>limon</i>	1	0	0,786	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
• Orangers (O)																	
Owa	Washington Navel	<i>sinensis</i>	<i>sinensis</i>	1	1	0,757											
Odf	Double Fine	<i>sinensis</i>	<i>sinensis</i>	1	1	0,778											
Ota	Tarocco	<i>sinensis</i>	<i>sinensis</i>	1	1	0,772											
Onh	New Hall	<i>sinensis</i>	<i>sinensis</i>	1	1	0,778											
Ona	Navelina	<i>sinensis</i>	<i>sinensis</i>	1	1	0,755	22	11	23	24	33	22	23	33	12	22	12
Oha	Hamlin	<i>sinensis</i>	<i>sinensis</i>	1	1	0,749											
Osh	Shamouti	<i>sinensis</i>	<i>sinensis</i>	1	1	0,756											
Opb	Parson Brown	<i>sinensis</i>	<i>sinensis</i>	1	1	0,756											
Oca	Cadenera	<i>sinensis</i>	<i>sinensis</i>	1	1	0,751											

Tableau 1. Suite.

Code	Cultivar	Nom d'espèce		Marqueur morpho.	Taille du génome (pg/2C)	Génotype enzymatique											
		SWINGLE et REECE (1967)	TANAKA (1961)			iso.	ADH-1 AAT	IDH LAP	MDH-1 MDH-2	PGI PGM-1	PGM-2 PER	SKDH					
Ovl	Valencia Late	<i>sinensis</i>	<i>sinensis</i>	1	1	0,757											
• Bigaradiers et bouquetiers (B)																	
Bfe	Ferrando	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	1	1	0,755											
Bfl	Floride	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	1	1	0,755											
Bse	Sans épines	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	1	1	0,779											
Bma	Maroc	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	1	1	0,750											
Bqn	Nice (bouquetier)	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	1	1	0,756											
Bqf	Fleurs (bouquetier)	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	1	1	0,750	22	11	33	44	33	22	24	13	12	12	22
Bbs	Brazil Sour	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	1	1	—											
Bdd	Dai Dai	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	1	1	0,756											
Btu	Tuléar	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	1	1	—											
Bav	Avanito	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	0	1	—											
Bgr	Granito	<i>aurantium</i>	<i>aurantium</i>	1	0	0,753	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
• Cédraiers (K)																	
Kdc	Corse	<i>medica</i>	<i>medica</i>	1	1	0,814											
Ket	Etrog	<i>medica</i>	<i>limonimedica</i>	1	1	0,821											
Kde	Digitte	<i>medica</i>	<i>medica</i>	1	1	0,815	22	22	22	66	11	22	22	22	11	22	
Kpc	Poncire	<i>medica</i>	<i>medica</i>	1	1	0,807											
Kdi	Diamante	<i>medica</i>	<i>medica</i>	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
• Pomelos (G)																	
Gsh	Shambar	<i>paradisi</i>	<i>paradisi</i>	1	1	0,749											
Gce	Cecily	<i>paradisi</i>	<i>paradisi</i>	1	1	0,778											
Gal	Alanoek	<i>paradisi</i>	<i>paradisi</i>	1	1	0,759											
Gre	Reed	<i>paradisi</i>	<i>paradisi</i>	1	1	0,772											
Gsr	Star Ruby	<i>paradisi</i>	<i>paradisi</i>	1	1	0,772	22	12	33	25	33	22	22	13	11	12	23
Grb	Red Blush	<i>paradisi</i>	<i>paradisi</i>	1	1	0,788											
Glr	Little River	<i>paradisi</i>	<i>paradisi</i>	1	1	0,784											
Gth	Thomson	<i>paradisi</i>	<i>paradisi</i>	1	1	0,784											

Tableau 1. Suite.

Code	Cultivar	Nom d'espèce		Marqueur		Taille du génome (pg/2C)	Génotype enzymatique										
		SWINGLE et REECE (1967)	TANAKA (1961)	morpho.	iso.		ADH-1 AAT	IDH LAP	MDH-1 MDH-2	PGI PGM-1	PGM-2 PER	SKDH					
Gma	Marsh	<i>paradisi</i>	<i>paradisi</i>	1	1	0,783											
Gru	Ruby	<i>paradisi</i>	<i>paradisi</i>	1	0	0,781	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
• Autres Citrus																	
ROL	<i>rough lemon</i>	<i>limon</i>	<i>jambhiri</i>	1	1	0,777	12	12	23	46	13	22	23	22	11	22	
PEC	<i>pectinifera</i>	<i>reticulata hybrid</i>	<i>depressa</i>	1	1	0,751	22	11	33	24	23	22	33	33	22	12	33
JUN	—	<i>ichang austera</i>	<i>junos</i>	1	1	0,810	22	12	33	24	23	22	33	13	12	11	22
GUL	—	<i>maxima</i>	<i>pseudogulgul</i>	1	1	0,745	22	12	33	24	33	22	23	11	11	11	22
ICH	<i>ichangensis lemon</i>	<i>ichangensis</i>	<i>ichangensis</i>	1	1	0,774	22	11	22	44	23	22	23	34	12	11	22
BGM	bergamotier	<i>aurantifolia</i>	<i>bergamia</i>	1	1	0,771	22	12	13	44	13	22	24	13	12	11	12
PDC	poire du commandeur	<i>limon</i>	<i>lumia</i>	1	1	—	22	12	33	24	33	22	22	34	12	12	22
COM	<i>combava</i>	<i>hystrix</i>	<i>hystrix</i>	1	1	0,803	22	12	33	14	12	22	22	33	11	11	12
INT	—	<i>paradisi</i>	<i>intermedia</i>	1	1	0,764	22	12	33	23	33	22	23	23	11	12	22
MAC	—	<i>aurantifolia</i>	<i>macrophylla</i>	1	1	0,798	22	22	23	44	12	22	12	23	12	11	22
PEN	—	<i>aurantifolia</i>	<i>pennivesiculata</i>	1	1	0,813	22	22	13	22	11	12	22	23	12	11	12
EXE	—	<i>aurantifolia</i>	<i>excelsa</i>	1	1	0,793	22	22	23	44	33	12	12	23	22	11	22
SIA	siamelo	<i>hybrid</i>	<i>hybrid</i>	1	1	0,745	22	11	33	24	33	22	23	33	12	11	12
KPA	<i>khasi papeda</i>	<i>latipes</i>	<i>latipes</i>	1	1	0,780	22	12	34	44	23	23	12	34	12	11	12
HAL	—	<i>halimii</i>	<i>halimii</i>	1	1	0,778	22	22	22	44	22	23	12	34	22	11	22
VOL	—	<i>limon</i>	<i>limonia</i>	1	1	0,764	12	12	13	46	13	22	23	22	22	11	12
NAS	<i>nasnaran</i>	<i>reticulata hybrid</i>	<i>amblycarpa</i>	0	1	—	12	12	33	44	33	22	13	33	11	11	12

* Les codes notés en caractères gras représentent le type enzymatique commun dans les analyses. Tous les individus d'une même zone grisée présentent le même profil enzymatique.

les variétés nouvellement sélectionnées dans le monde. La station de l'Inra et du Cirad de San Giuliano, en France, possède un statut unique du fait du contexte phytosanitaire favorable de la Corse. Elle abrite une importante collection de matériel végétal sain, qui inclut de nombreuses accessions d'Asie du Sud-Est, et peut être évaluée en plein champ. Le logiciel de gestion de bases de données Egid, élaboré par le Cirad et l'Inra (COTTIN *et al.*, 1995) à partir des descripteurs de l'IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute), a par ailleurs été adopté par la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) pour mettre en place un réseau global de gestion des ressources génétiques des agrumes.

L'organisation de la diversité

La variabilité agromorphologique

La variabilité agromorphologique des agrumes est considérable. Elle concerne aussi bien les caractères pomologiques et organoleptiques que les résistances aux facteurs biotiques et abiotiques. Le genre *Citrus* renferme ainsi de nombreuses sources de tolérance aux contraintes biotiques et abiotiques, qui ouvrent des perspectives intéressantes pour l'utilisation des ressources génétiques en amélioration variétale.

Pour les facteurs abiotiques on peut citer : la tolérance au froid des mandariniers Satsuma ; la tolérance à la salinité du limettier Rangpur et du mandarinier Cléopâtre ; la tolérance aux sols calcaires de *C. jambhiri*, de *C. macrophylla*, de *C. volkameriana*, de *C. amblycarpa* et du bigaradier ; la tolérance à la sécheresse du limettier Rangpur. Des tolérances aux principaux ravageurs et aux maladies sont également identifiées : la tolérance à *Phytophthora* sp. des pamplemoussiers, des bigaradiers, de *C. volkameriana* et de *C. amblycarpa* ; la tolérance à la cercosporiose africaine des agrumes des pamplemoussiers, des citronniers et des mandariniers Satsuma et Beauty ; la tolérance à la *tristeza* du mandarinier Cléopâtre, de *C. amblycarpa*, du limettier Rangpur, de *C. jambhiri* et de *C. volkameriana* ; la tolérance au *blight* de l'oranger ; la tolérance au *greening* des pamplemoussiers et de certains mandariniers originaires de la zone tropicale ; la tolérance au chancre citrique dû à *Xanthomonas campestris* de *C. junos* et de certains mandariniers (Satsuma, Dancy...) ; la résistance aux acaridés phytophages du pomelo Marsh et des mandariniers Satsuma et Dancy. Au vu des exemples précédents, il ne semble pas exister de liens entre la répartition des sources de résistance aux facteurs biotiques et la structuration spécifique du genre *Citrus*.

A l'inverse, la variabilité morphophysiological est fortement marquée entre les espèces, même si certains caractères sélectionnés par l'homme présentent une

forte diversité intraspécifique (précocité, calibre, coloration des fruits). A titre d'exemple, au sein du genre *Citrus*, le diamètre des fruits varie de quelques centimètres pour certains mandariniers et limettiers à plus de 30 centimètres pour certains pamplemoussiers. L'albédo est quasi inexistant chez les mandariniers mais constitue l'essentiel du fruit chez les cédratiers. La pulpe du fruit est verte, orange, jaune ou rouge, son acidité est nulle pour certaines oranges douces et très forte pour les limes et les citrons. Si les feuilles de toutes les espèces du genre *Citrus* sont monofoliées, leur taille et leur forme ainsi que la morphogénèse des arbres varient considérablement suivant les espèces.

Une étude plus fine de la structuration de la diversité morphologique dans le genre *Citrus* a été réalisée à partir de 20 descripteurs de l'appareil végétatif observés sur 74 cultivars. Elle sert de support à l'analyse des relations entre la diversité morphologique et la diversité moléculaire présentée dans ce chapitre.

La variabilité biochimique et moléculaire

Les huiles essentielles et les polyphénols ont été les premiers marqueurs utilisés pour caractériser les variétés (TATUM *et al.*, 1974) et pour étudier la phylogénie des agrumes (SCORA, 1988). Les isoenzymes sont employées en routine pour identifier les plants de semis zygotiques et nucellaires (SOOST *et al.*, 1980 ; KHAN et ROOSE, 1988 ; OLLITRAULT *et al.*, 1992). Elles ont également permis de préciser les relations phylogéniques entre les espèces (TORRES *et al.*, 1982 ; HIRAI *et al.*, 1986 ; OLLITRAULT et FAURE 1992 ; HERRERO *et al.*, 1996 ; 1997). Les techniques d'analyse directe du polymorphisme de l'ADN — RFLP, RAPD, VNTR — ont principalement été appliquées dans des programmes de cartographie du génome (DURHAM *et al.*, 1992 ; JARREL *et al.*, 1992 ; LURO *et al.*, 1994b) ou de caractérisation variétale et de taxonomie (LURO *et al.*, 1994a ; LURO *et al.*, 1995 ; FANG et ROOSE, 1996). Toutefois, le déterminisme allélique de ces marqueurs est parfois difficile à clarifier, ce qui limite leur utilisation pour des études de génétique des populations s'intéressant à l'hétérozygotie et aux index de fixation ou de déséquilibre gamétique.

Des études cytogénétiques et des analyses par cytométrie en flux ont par ailleurs démontré l'existence de fortes variations entre les espèces quant à la taille des chromosomes (NAIR et RANDHAWA, 1969 ; OLLITRAULT *et al.*, 1994). Elles ont également mis en évidence de nombreux cas d'hétérozygotie structurale (RAGHUVANSHI, 1969 ; GMITTER *et al.*, 1992 ; GUERRA, 1993 ; MIRANDA *et al.*, 1997). Ces éléments sur la structure des génomes des différents taxons sont déterminants pour analyser l'organisation de la diversité allélique en termes évolutifs.

Afin d'étudier les paramètres de structure des populations, l'analyse de la diversité allélique présentée dans ce chapitre repose sur le polymorphisme de 9 systèmes isoenzymatiques. La diversité structurale nucléaire est pour sa part examinée en évaluant la taille des génomes par cytométrie en flux. L'échan-

tillonnage variétal des formes cultivées est le même que pour l'étude de la diversité morphologique. Dix-sept *Citrus* non cultivés complètent l'analyse.

LA DIVERSITÉ ISOENZYMATIQUE

Trente-cinq allèles ont été identifiés pour 11 locus polymorphes. Seuls 5 de ces allèles ne sont pas observés chez les cultivars. L'allèle nul du locus *LAP* (*LAP-6*), identifié à l'état homozygote chez les cédratiers, a pu être mis en évidence à l'état hétérozygote chez un certain nombre d'agrumes acides (citronniers, limes...) par l'examen d'hybrides contrôlés. De nombreux cultivars d'une même espèce peuvent présenter des profils identiques. C'est en particulier le cas pour les orangers, les bigaradiers, les pomelos et les citronniers. Les 74 cultivars sont ainsi regroupés en 30 génotypes isoenzymatiques (tableau 1).

La diversité intraspécifique analysée pour les espèces comestibles apparaît très contrastée (tableau 2). Les cédratiers présentent une diversité allélique nulle due à une forte homozygotie et à l'absence de polymorphisme entre les cultivars. Les pomelos, les orangers et les bigaradiers ont des structures intraspécifiques similaires. La diversité allélique et l'hétérozygotie y sont modérées ; le polymorphisme intercultivar est inexistant. Les citronniers sont très hétérozygotes et leur polymorphisme intervariétal est très faible puisqu'un seul cultivar, le citron Meyer, se distingue des neuf autres. Les limettiers sont également très hétérozygotes mais manifestent un plus fort polymorphisme intervariétal que les citronniers. Les pamplemoussiers et les mandariniers offrent une très grande richesse allélique, principalement due à un fort polymorphisme intervariétal. Les deux espèces qui possèdent une forte diversité intercultivar — les mandariniers et les pamplemoussiers — ne présentent pas d'écart significatif à la pan-

Tableau 2. Structuration de la diversité allélique intraspécifique observée pour 11 locus codant pour des isoenzymes.

	Effectif	Nombre moyen d'allèles par locus	Diversité totale	Diversité inter-cultivar	Hétérozygotie observée	Ecart à la panmixie
Cédratier	4	1,00	0,00	0,00	0,00	—
Pomelo	10	1,45	0,23	0,00	0,45	*** (5 locus)
Bigaradier	10	1,36	0,18	0,00	0,36	*** (4 locus)
Oranger	10	1,45	0,23	0,00	0,45	*** (5 locus)
Citronnier	10	2,00	0,42	0,02	0,82	*** (9 locus)
Limettier	10	2,09	0,34	0,08	0,54	** (2 locus)
Pamplemoussier	10	2,09	0,25	0,13	0,24	ns
Mandarinier	10	2,00	0,19	0,10	0,17	ns

ns : non significatif au seuil de 5 % ; ** : significatif au seuil de 1 % ; *** : significatif au seuil de 1 %.

mixie, ce qui témoigne sans doute d'importants brassages génétiques au sein de ces taxons. Toutes les autres espèces, à l'exception des cédratiers qui sont totalement fixés, présentent un excès d'hétérozygotes.

La diversité totale au sens de Nei (1973) de l'échantillon des agrumes cultivés est de 0,45. Elle se décompose de manière équilibrée en termes de diversité intraspécifique (0,23) et de diversité interspécifique (0,22), soit une valeur élevée du coefficient G_{ST} (0,49). Cette valeur traduit une différenciation allélique marquée entre les taxons cultivés. Celle-ci est en effet significative pour 10 des 11 locus analysés. Cette différenciation entre taxons, observée pour la quasi-totalité des locus, se retrouve dans la structuration multilocus évaluée à partir des 30 génotypes de *Citrus* cultivés. Les déséquilibres de liaison concernent ainsi 23 couples de locus sur 55 et intéressent 9 locus sur 11.

Cette forte structuration observée au sein des cultivars est confirmée lorsque l'on s'intéresse aux 47 génotypes enzymatiques identifiés, qui associent aux 30 génotypes des cultivars ceux des 17 autres *Citrus*. Neuf locus sur 11 présentent en effet un écart à la panmixie significatif avec un défaut d'hétérozygotes. Ce type d'écart est classiquement lié à la structuration en sous-populations (effet Walhund) et aux systèmes de reproduction limitant les flux de gènes.

Le fort niveau de structuration génétique constaté grâce aux paramètres de génétique des populations se retrouve dans l'analyse factorielle sur tableau de distances réalisée sur les génotypes des cultivars, où 50,4 % de la variance totale est représentée sur le plan 1-2 (figure 2). La diversité des *Citrus* cultivés se structure autour de trois pôles : le premier regroupe les mandariniers, le deuxième associe les pamplemoussiers et les pomelos, le troisième est formé par les cédratiers, qui présentent un apparemment marqué avec les limettiers. Les orangers et les bigaradiers sont voisins des mandariniers avec une probable introgression des pamplemoussiers. Les citronniers, très hétérozygotes, pourraient être issus d'une hybridation entre le groupe constitué par les mandariniers, les orangers et les bigaradiers et le groupe des limettiers. L'analyse factorielle permet en effet, pour cette population très structurée, d'identifier les formes hybrides et leurs parents potentiels.

Cette structuration des formes cultivées en trois pôles n'est pas remise en cause par l'introduction des formes non cultivées comme le montre l'arbre de diversité construit (figure 3). Certains *Citrus* non cultivés sont associés aux groupes formés par les cultivars : *C. pectinifera* aux mandariniers ; le siamelo aux orangers ; le *pseudogulgul* et *C. intermedia* au groupe des pamplemoussiers et des pomelos ; *C. pennivesiculata*, *C. volkameriana* et le *rough lemon* au groupe des limettiers. Les autres se distinguent de ces groupes soit parce qu'ils portent des allèles qui n'ont pas été observés chez les cultivars — c'est le cas de *C. macrophylla*, de *C. excelsa*, de *C. junos*, de l'*ichangensis lemon*, du *khasi papeda*, du *combava* et du *nasnaran* —, soit parce qu'ils présentent des structures alléliques recombinées originales, comme le bergamotier et la poire du commandeur.

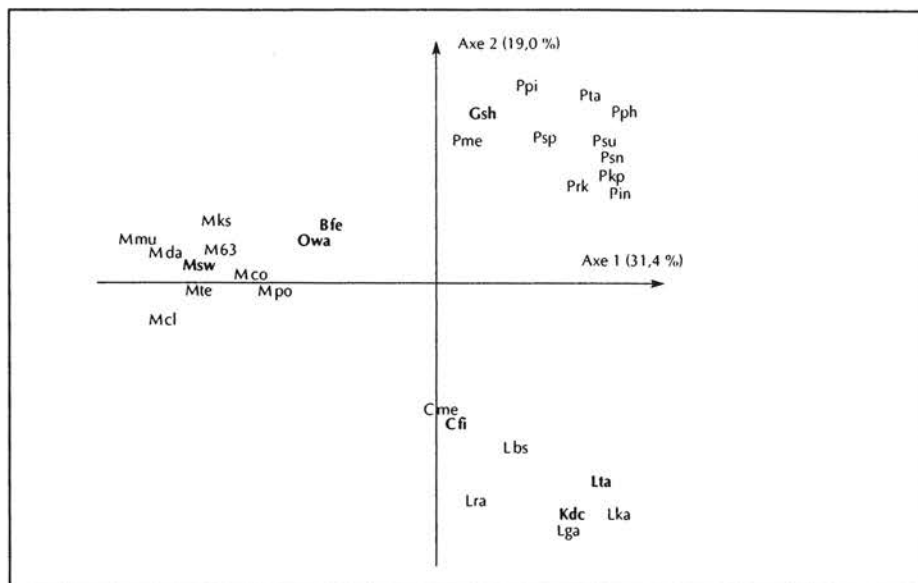


Figure 2. Diversité isoenzymatique des agrumes cultivés sur la base de 11 locus : représentation du premier plan factoriel de l'AFTD réalisée sur une matrice de dissimilarité de Dice entre les 30 génotypes différents identifiés parmi 74 cultivars. Les codes utilisés sont ceux du tableau 1.

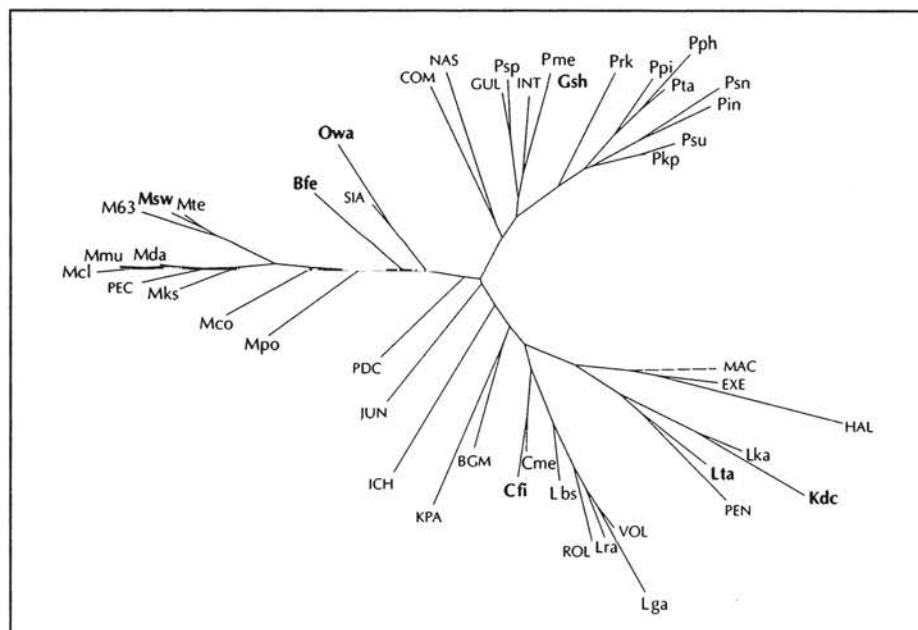


Figure 3. Diversité isoenzymatique du genre Citrus sur la base de 11 locus : représentation arborée, selon la méthode NJ, réalisée sur une matrice de dissimilarité de Dice entre 47 génotypes (30 génotypes cultivés et 17 autres Citrus). Les codes utilisés sont ceux du tableau 1.

LA TAILLE DES GÉNOMES

Les tailles des génomes nucléaires des individus sont données dans le tableau 1. Les génotypes diploïdes ont des génomes de taille relativement petite, comprise entre 0,73 et 0,82 picogramme d'ADN par génome diploïde (figure 4). Les valeurs de 1,17 picogramme correspondent à des génotypes triploïdes ; elles ont été observées pour quatre cultivars de limettier, Tahiti, Bears, Elkseur, IAC SRA618. Parmi les espèces comestibles, les différences interspécifiques sont statistiquement significatives et représentent un écart de 10 % entre les mandariniers et le cédratiers (figure 5). Les autres espèces se répartissent en deux groupes de tailles intermédiaires. L'un associe les orangers et les bigaradiers, l'autre, correspondant à des tailles supérieures, regroupe les citronniers, les limettiers, les pamplemoussiers et les pomelos. Les types non comestibles présentent eux aussi des tailles de génome comprises entre celle des mandariniers et celle des cédratiers. Ainsi, deux des trois taxons qui structurent la

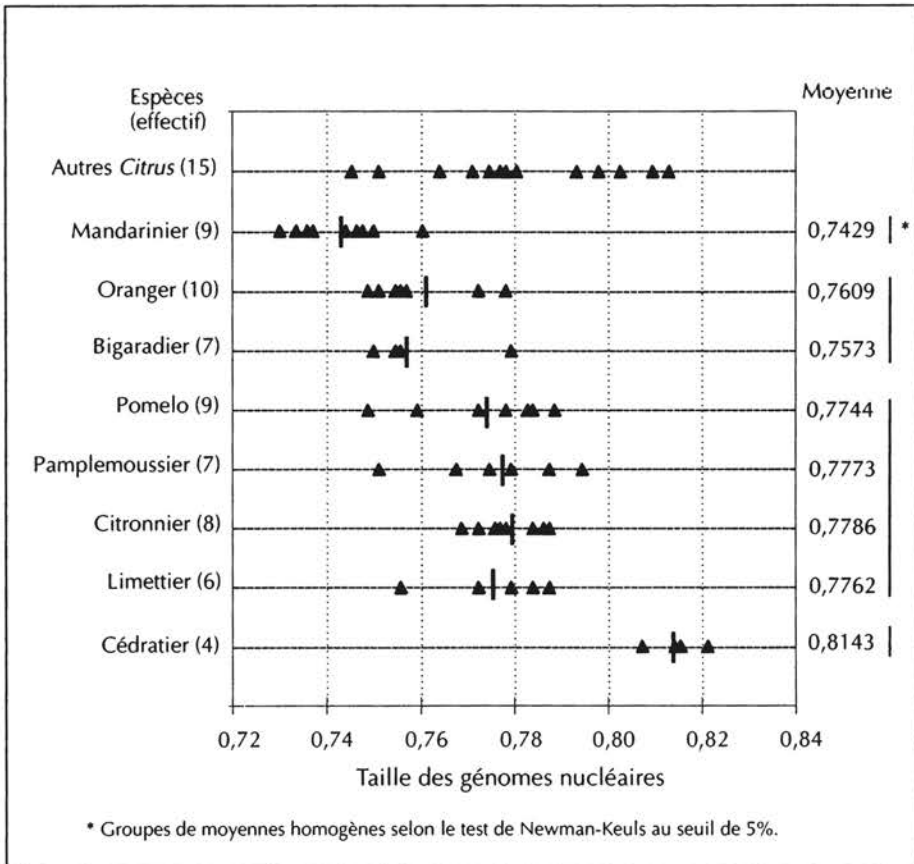


Figure 4. Taille des génomes nucléaires de 75 individus, dont 60 cultivars comestibles regroupés par espèces (moyennes de 3 mesures données en picogrammes d'ADN par génome diploïde).

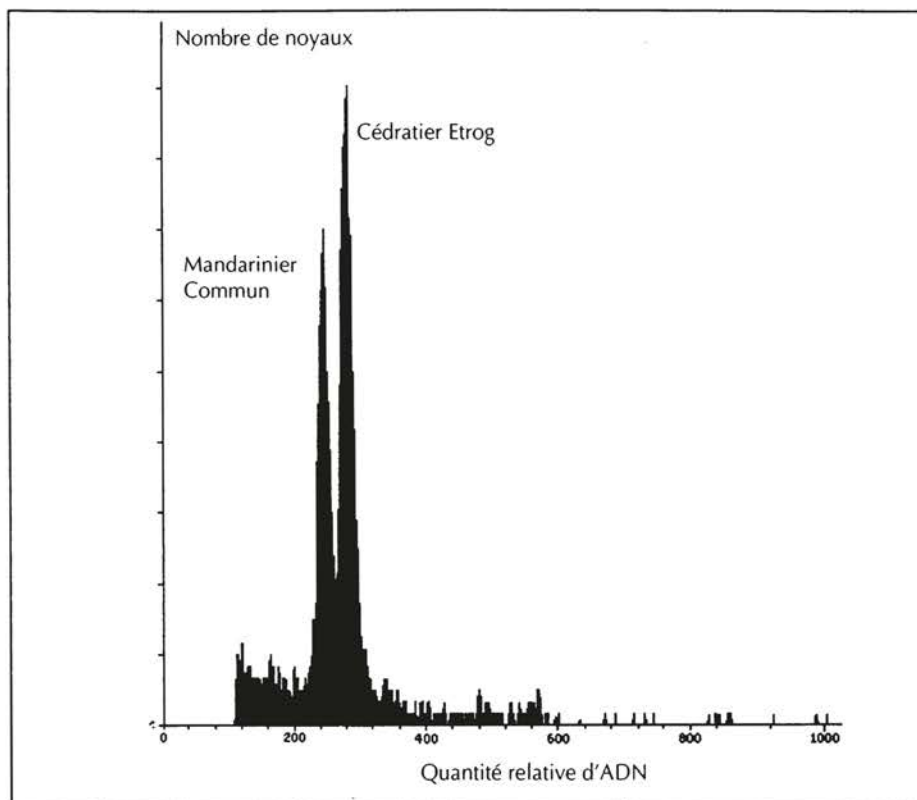


Figure 5. Tailles relatives des génomes nucléaires du cédratier Etrog et du mandarinier Commun : cytométrie en flux d'un mélange de noyaux colorés à l'iodure de propidium.

diversité, le mandarinier et le cédratier, possèdent les tailles de génome extrêmes observées dans le genre *Citrus*. Les autres taxons ont des tailles de génome qui concordent avec les affinités génétiques déterminées par les analyses isoenzymatiques.

Les relations entre les différents niveaux de variabilité

L'analyse de la diversité morphologique réalisée à partir de 20 descripteurs végétatifs permet de retrouver la structuration globale autour des trois pôles précédemment identifiés d'après les données isoenzymatiques (figure 6). Les positions relatives des espèces cultivées autour de ces trois pôles sont dans l'ensemble conservées. En revanche, les espèces monomorphes du point de vue enzymatique présentent une dispersion morphologique équivalente à celle des espèces polymorphes sur le plan moléculaire (figure 7). Deux niveaux

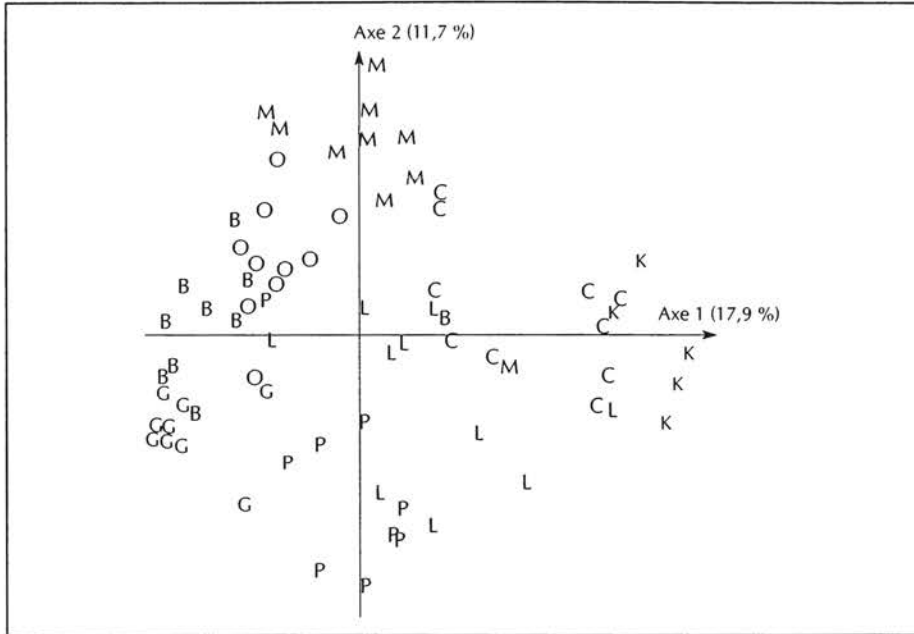


Figure 6. Diversité morphologique : représentation du premier plan factoriel de l'AFTD réalisée sur une matrice de distance de Sokal et Michener entre 74 cultivars sur la base de 20 descripteurs végétatifs. Les codes utilisés sont ceux du tableau 1.

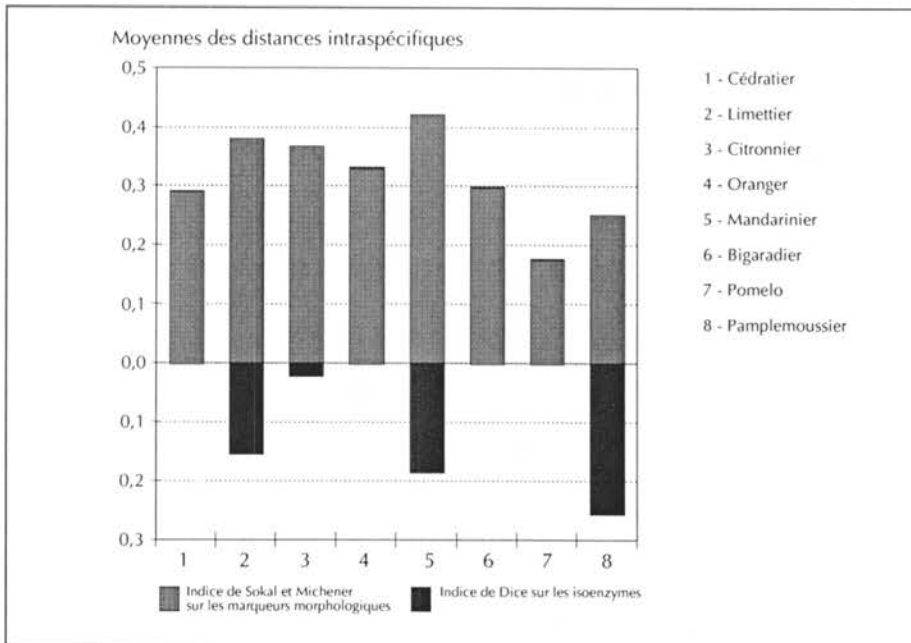


Figure 7. Illustration simultanée de la dispersion intraspécifique calculée avec les marqueurs isoenzymatiques et morphologiques.

coexistent donc dans la structuration de la diversité morphologique : un niveau majeur, qui répond à des contraintes affectant l'évolution du génome dans son ensemble, et un niveau secondaire, dissocié de l'évolution moléculaire visualisée par les isoenzymes.

La structuration interspécifique

Hormis le système d'auto-incompatibilité gamétophytique, il n'existe pas d'incompatibilité sexuelle au sein du genre *Citrus* : des hybrides sont obtenus aisément pour l'ensemble des combinaisons interspécifiques. Il était ainsi envisageable de remettre en cause la notion même de différenciation spécifique. Il apparaît toutefois que ce genre est très fortement structuré dans la mesure où des déséquilibres gamétiques généralisés ont été identifiés pour les isoenzymes et où les grands axes de structuration moléculaire et morphologique apparaissent similaires. Cela traduit une organisation en sous-populations, entre lesquelles les flux de gènes sont limités, comme le confirment les écarts à la panmixie observés pour la quasi-totalité des locus.

La structuration des agrumes autour de trois pôles — pamplemoussiers, mandariniers, cédratiers — obtenue dans nos analyses est compatible avec les données de GREEN *et al.* (1986) pour l'ADN chloroplastique et de HANDA *et al.* (1986) pour les protéines totales. Elle confirme les résultats de taxonomie numérique de BARRET et RHODES (1976), qui avaient suggéré que ces trois taxons étaient à l'origine de l'ensemble des *Citrus* cultivés. La différenciation entre ces taxons sexuellement compatibles s'explique par un processus de fondation dans trois zones géographiques et par une évolution allopatrique. Les pamplemoussiers seraient en effet originaires de l'archipel malais et de l'Indonésie, les cédratiers auraient évolué dans le nord-est de l'Inde et dans les régions voisines de Birmanie et de Chine, tandis que les mandariniers se seraient diversifiés dans une région qui couvre le Vietnam, la Chine du Sud et le Japon (WEBBER, 1967 ; SCORA, 1975).

Les autres espèces cultivées — orangers, bigaradiers, citronniers, pomelos, limettiers — seraient apparues ensuite par recombinaison entre ces taxons de base, mis en contact au gré des échanges commerciaux et des migrations humaines. Les données enzymatiques — hétérozygotie généralement élevée et absence de polymorphisme intervariétal — prouvent qu'il s'agit de cas typiques de fausses espèces, pour lesquelles la diversification variétale s'est produite à partir d'un hybride ancestral par accumulation de mutations sans qu'intervienne la recombinaison sexuée. Il est à noter que tous les cultivars de ces espèces sont polyembryonnés ce qui a permis de fixer l'hétérozygotie et de conserver le type morphologique et pomologique alors que les méthodes de propagation végétative, comme le marcottage, le bouturage ou le greffage, n'existaient pas.

La forte structuration, encore observée aujourd'hui tant à l'échelle moléculaire que morphologique, indique que les brassages génétiques entre les trois groupes originels sont limités. L'apomixie partielle, liée à la polyembryonie, a très certainement été un élément essentiel dans la limitation des flux de gènes. D'autres facteurs, comme la différenciation structurelle des génomes, ont dû également favoriser le maintien de déséquilibres gamétiques en limitant la recombinaison sur de larges portions du génome. Cette différenciation dans la taille de génome est en accord avec les observations cytogénétiques de NAIR et RANDHAWA (1969) et de RAGHUVANSHI (1969). Elle témoigne du stade avancé qu'ont atteint les trois taxons de base sur la voie d'une réelle spéciation.

La diversification intraspécifique

Le polymorphisme morphologique intervariétal, relativement important au sein des orangers, des bigaradiers, des pomelos, des citronniers et des limettiers, s'explique en grande partie par la sélection humaine. Celle-ci est particulièrement marquée pour les critères pomologiques et phénologiques. Elle peut entraîner une évolution morphophysologique rapide, indépendante de l'évolution moléculaire analysée grâce aux isoenzymes. L'exemple le plus flagrant est celui du clémentinier. Apparu il y a environ un siècle dans un semis de mandarinier Commun réalisé par le père Clément, il a connu depuis une diversification considérable. Cette diversification, résultat d'une simple sélection en verger des mutations de bourgeons, concerne tant la précocité — la période de production s'étend aujourd'hui d'octobre à mars — que les caractères pomologiques, comme le calibre, la coloration et la présence de pépins (BONO *et al.*, 1982).

En revanche, la recombinaison sexuée a dû jouer un rôle déterminant dans la diversification des pamplemoussiers, pour lesquels les cultivars sont tous monoembryonnés, et dans celle des mandariniers, dont certains cultivars sont monoembryonnés. Ils présentent en effet un polymorphisme isoenzymatique intervariétal élevé sans écart significatif à la panmixie.

La gestion des ressources génétiques

La situation des agrumes illustre bien l'intérêt et les limites des marqueurs moléculaires pour la construction de *core collections*. On retrouve en effet dans l'évolution du genre *Citrus* des facteurs qui concourent, à l'échelle globale, à une bonne corrélation entre la structuration de la diversité phénotypique et la structuration de la diversité moléculaire (effet de fondation, évolution allopatrique et limitation des flux de gènes autorisant le maintien de déséquilibres gamétiques globaux). Pour les espèces secondaires, il existe également, sur le plan intraspécifique, des mécanismes évolutifs, tels que la reproduction somatique et les fortes pressions de sélection sur les mutations affectant les caractères morphophysologiques, qui conduisent à dissocier les deux

niveaux d'évolution. Dans le cas des agrumes, le principal intérêt des études de marquage réside dans l'identification des séquences et des facteurs évolutifs à l'origine des taxons et de leur diversification. La réflexion sur la constitution d'une *core collection* doit donc reposer davantage sur ces enseignements généraux que sur la constitution allélique d'individus.

Parmi les trois espèces de base, les pamplemoussiers et les mandariniers présentent un polymorphisme moléculaire important. L'amélioration variétale intraspécifique peut être réalisée traditionnellement par hybridation sexuée. La gestion des ressources génétiques intraspécifiques peut donc se raisonner classiquement sous forme de *core collections*. Les résultats obtenus sur une collection d'une centaine de mandariniers témoignent de l'existence d'une forte structuration à l'échelle intraspécifique, qui pourrait permettre d'établir, pour partie, une stratégie d'échantillonnage sur la base des données moléculaires.

Les ensembles de caractères définissant les autres espèces cultivées — orangers, bigaradiers, pomelos, citronniers — reposent sur des génotypes qui ont une hétérozygotie relativement élevée mais qui sont stabilisés par la multiplication végétative. La conservation des ressources génétiques de chacune de ces espèces doit s'appuyer sur la constitution de collections de génotypes. Cette diversité intraspécifique peut difficilement être recombinaisonnée par voie sexuée pour améliorer l'« espèce » puisque les caractères définissant l'« espèce » sont alors recombinaisonnés. Ces collections, qui visent à conserver la plus large diversité adaptative et morphophysiological au sein de chaque « espèce », doivent en revanche permettre de proposer aux agrumiculteurs les cultivars les mieux adaptés aux différentes régions de production. Le marquage moléculaire n'apportant aucune information à ce niveau compte tenu des mécanismes d'évolution intraspécifique préalablement décrits, la stratification doit se fonder principalement sur les critères géographiques et sur les données agromorphologiques.

Si l'on s'intéresse aux agrumes en général, la gestion des ressources génétiques peut se raisonner également en termes de conservatoire de gènes. Le groupe de trois taxons identifiés comme étant à l'origine des diverses formes cultivées constitue alors un réservoir essentiel puisqu'une grande part de la diversité allélique y réside au niveau intercultivar. Les mandariniers et les pamplemoussiers paraissent à ce titre devoir posséder une importance plus grande dans les conservatoires. Par ailleurs, certains agrumes non cultivés apportent, comme le montre notre étude, un enrichissement de la diversité allélique. Ces taxons ne sont donc pas des combinaisons génotypiques particulières issues d'hybridation entre les trois taxons de base des formes cultivées. Leur conservation apparaît essentielle, en particulier pour les tolérances aux facteurs biotiques ou abiotiques qu'ils peuvent apporter dans l'amélioration des porte-greffe. Enfin, le développement des biotechnologies, en particulier de l'hybridation somatique, élargit considérablement le pool génique exploitable pour les porte-greffe (GROSSER *et al.*, 1996). Il convient donc aujourd'hui de raisonner la conservation des ressources génétiques des agrumes à l'échelon de la tribu des *Citreae*.

Annexe

Matériel végétal

Soixante-quatorze cultivars représentant les 8 espèces cultivées pour leurs fruits (SWINGLE et REECE, 1967) et 17 types non consommés, mais dont certains sont utilisés comme porte-greffe, ont servi de base à l'étude enzymatique (tableau 1). Dans la mesure du possible 10 cultivars ont été retenus pour chaque espèce cultivée, à l'exception du cédratier pour lequel nous ne disposons que de 4 géotypes en collection. Les arbres, indemnes de toute maladie virale ou viroïdale, sont cultivés sur la station de recherche agronomique de l'Inra et du Cirad de San Giuliano, en Corse. Quatre-vingt-dix de ces géotypes y ont fait l'objet d'une description morphologique.

Analyses enzymatiques

Neuf systèmes enzymatiques ont été analysés par électrophorèse sur gel d'amidon ou de polyacrylamide (OLLITRAULT *et al.*, 1992) : alcool déshydrogénase (ADH), malate déshydrogénase (MDH), isocitrate déshydrogénase (IDH), shikimate déshydrogénase (SKDH), phosphoglucomutase (PGM), phosphogluco-isomérase (PGI), peroxydases (PER), leucine aminopeptidase (LAP) et aspartate aminotransférase (AAT). Pour le locus *PGM-2*, seules deux positions alléliques ont été retenues. Pour les autres systèmes, l'interprétation et la nomenclature allélique reprennent celles de OLLITRAULT *et al.* (1992) et sont en accord avec l'interprétation donnée par TORRES *et al.* (1978 ; 1982) pour les MDH, IDH, PGI et LAP.

Analyses par cytométrie en flux

La taille du génome nucléaire de chacun des géotypes diploïdes a été estimée par la moyenne de trois mesures relatives à celle d'un cultivar triploïde (la lime Tahiti), utilisé comme témoin interne. Des morceaux de feuille de l'échantillon et du témoin sont préparés en mélange et colorés à l'iodure de propidium selon le protocole décrit par OLLITRAULT *et al.* (1994). Deux mille noyaux sont ensuite analysés sur un cytomètre Fasca. La taille du génome nucléaire de chaque géotype est estimée en picogrammes par génome diploïde à partir de la moyenne des valeurs relatives multipliée par 1,17 picogramme, qui correspond à la taille du génome de la lime Tahiti estimée par OLLITRAULT *et al.* (1994).

Etudes morphologiques

Vingt descripteurs qualitatifs de l'appareil végétatif (tableau 3) ont été étudiés. L'ensemble des données sur la morphologie des agrumes est géré par le système de gestion du matériel génétique des agrumes en réseau, Egid (COTTIN *et al.*, 1995).

Analyses statistiques

L'étude des paramètres de structuration génétique est réalisée à l'aide du logiciel Genepop pour l'analyse des écarts à la panmixie, de la différenciation entre taxons cultivés (étude de la répartition des allèles dans les espèces par le test exact de Fisher) et des déséquilibres gamétiques. Les paramètres descriptifs de la diversité — diversité totale, diversité entre taxons, diversité entre individus, G_{ST} — sont ceux qui ont été proposés par NEI (1973). Les représentations arborées et les analyses factorielles sur tableaux de distances sont réalisées sur la base de matrice de distance de Dice pour les données enzymatiques et de matrice de distance de Sokal et Michener pour les données morphologiques. Les arbres sont construits par la méthode du *neighbor-joining* à l'aide du logiciel Darwin (PERRIER *et al.*, 1999).

Tableau 3. Les vingt descripteurs qualitatifs morphologiques.

A. Port de l'arbre	M. Longueur des épines
1 érigé	1 nulle
2 sphéroïde	2 très courte (0 à 5 mm)
3 élipsoïde aplati	3 courte (5 à 15 mm)
B. Position des branches	4 moyenne (15 à 40 mm)
1 érigée	5 longue (> 40 mm)
2 étalée	N. Forme de la section des jeunes rameaux
3 retombante	1 angulaire
4 pleureuse	2 ronde
C. Densité de frondaison	O. Bordure de la feuille
1 éparse	1 crénelée
2 dense	2 dentelée
D. Surface du tronc	3 entière
1 lisse	4 ondulée
2 rugueuse	P. Forme de la feuille
E. Couleur de la face supérieure des feuilles	1 elliptique
1 vert clair	2 ovale
2 verte	3 ovale inversée
3 vert foncé	4 lancéolée
F. Couleur de la face inférieure par rapport à la face supérieure	5 orticulaire
1 identique	Q. Longueur du pétiole
2 plus claire	1 nulle
G. Nervures sur la face supérieure	2 courte (0 à 10 mm)
1 proéminantes	3 moyenne (10 à 15 mm)
2 non proéminantes	4 longue (15 à 35 mm)
H. Angle de la base foliaire	5 très longue (> 35 mm)
1 aigu	R. Forme des ailettes
2 obtu	1 absente
I. Angle de l'apex foliaire	2 cordiforme
1 aigu	3 deltoïde
2 obtu	4 ovale
J. Articulation de la feuille	S. Taille des ailettes
1 présente	1 insignifiante
2 absente	2 petite
K. Attache du pétiole au rameau	3 moyenne
1 droite	4 grosse
2 coudée	5 énorme (égal au limbe)
L. Densité des épines	T. Couleur des jeunes pousses
1 nulle	1 anthocyanée
2 faible	2 verte
3 modérée	
4 forte	

Références bibliographiques

- BARRET H.C., RHODES A.M., 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany*, 1 : 105-136.
- BONO R., FERNANDEZ DE CORDOVA L., SOLER J., 1982. Arrufatina, Esbal and Guillermina, three Clementine mandarin mutations recently appearing in Spain. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 1 : 94-96.
- COTTIN R., ALLENT V., JACQUEMOND C., 1995. Gestion informatique des ressources génétiques : Egid. *In* : Symposium méditerranéen sur les mandarines. San Giuliano, France, Inra, p. 2.
- DURHAM R.E., LIU P.C., GMITTER R.G., MOORE G.A., 1992. Linkage map of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in *Citrus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 84 : 39-48.
- FANG D., ROOSE M.L., 1996. Fingerprinting citrus cultivars with inter-SSR markers. *Proceedings of the International Society of Citriculture* : 185-188.
- FAO, 1997. *Annuaire production : 1996*. Rome, Italie, FAO.
- GMITTER F.G., DENG X.X., HEARN C.J., 1992. Cytogenetic mechanism underlying reduced fertility and seedlessness in *Citrus*. *In* : VIIIth international citrus congress, p. 113-116.
- GREEN R.M., VARDI A., GALUN E., 1986. The plastome of *Citrus*: physical map, variation among *Citrus* cultivars and species and comparison with related genera. *Theoretical and Applied Genetics*, 72 : 170-177.
- GROSSER J.W., MOURAO-FO A.A., GMITTER F.G.JR., LOUZADA E.S., JIANG J., BAERGEN K., QUIROS A., CABASSON C., SCHELL J.L., CHANDLER J.L., 1996. Allotetraploid hybrids between *Citrus* and seven related genera produced by somatic hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, 92 : 577-582.
- GUERRA M.S., 1993. Cytogenetics of Rutaceae. 5. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. *Heredity*, 71 : 234-241.
- HANDA T., ISHIZAWA Y., OOGAKI C., 1986. Phylogenetic study of fraction I protein of *Citrus* and its close related genera. *Journal of Genetics*, 61 : 15-24.
- HERRERO R., ASINS M.J., CARBONELL E.A., NAVARRO L., 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantiodeae. 1. Intraspecies and intragenus genetic variability. *Theoretical and Applied Genetics*, 92 : 599-609.
- HERRERO R., ASINS M.J., PINA J.A., CARBONELL E.A., NAVARRO L., 1997. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantiodeae. 2. Genetic relationships among genera and species. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 : 1327-1334.
- HIRAI M., KOZAKI I., KAJIURA I., 1986. Isozyme analysis and phylogenetic relationship of *Citrus*. *Japanese Journal of Breeding*, 36 : 377-389.
- JARREL D.C., ROOSE M.L., TRAUUGH S.N., KUPPER R.S., 1992. A genetic map of *Citrus* based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 84 : 49-56.

- KHAN I.A., ROOSE M.L., 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113 : 105-110.
- KRUG C.A., 1943. Chromosome numbers in the subfamily Arantioideae, with special reference in the genus *Citrus*. *Citrus Botanical Gazette*, 104 : 602-611.
- LURO F., LAIGRET F., BOVE J.M., OLLITRAULT P., 1994a. Application of RAPD to *Citrus* genetics and taxonomy. *In* : VIIIth international citrus congress, p. 225-228.
- LURO F., LAIGRET F., OLLITRAULT P., BOVE J.M., 1995. DNA amplified fingerprinting (DAF); an useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. *HortScience*, 30 : 1063-1067.
- LURO F., LORIEUX M., LAIGRET F., BOVE J.M., OLLITRAULT P., 1994b. Genetic mapping of an intergeneric *Citrus* hybrid using molecular markers. *Fruits*, 49 : 404-408.
- MIRANDA M., IKEDA F., ENDO T., MORIGUCHI T., OMURA M., 1997. Chromosome markers and alterations in mitotic cells from interspecific *Citrus* somatic hybrids analysed by fluorochrome staining. *Plant Cell Reports*, 16 : 807-812.
- NAIR P.K.R., RANDHAWA G.S., 1969. Chromosome morphology of the pachytene stage with respect to different *Citrus* types. *In* : Ist international citrus symposium, p. 215-223.
- NEI M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 70 : 3321-3323.
- OLLITRAULT P., DAMBIER D., LURO F., DUPERRAY C., 1994. Nuclear genome size variations in *Citrus*. *Fruits*, 49 : 390-393.
- OLLITRAULT P., FAURE X., 1992. Système de reproduction et organisation de la diversité génétique dans le genre *Citrus*. *In* : Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes. Paris, France, BRG, p. 133-151.
- OLLITRAULT P., FAURE X., NORMAND F., 1992. Citrus rootstocks characterization with bark and leaf isozymes: application for distinguishing nucellar from zygotic trees. *In* : VIIIth international citrus congress, p. 338-341.
- OLLITRAULT P., LURO F., 1997. Les agrumes. *In* : L'amélioration des plantes tropicales, A. Charrier *et al.* éd., Montpellier, France, Cirad-Orstom, p. 13-36.
- PERRIER X., FLORI A., BONNOT F., 1999. Les méthodes d'analyse des données. *In* : Diversité génétique des plantes tropicales cultivées, P. Hamon *et al.* éd., Montpellier, France, Cirad, collection Repères, p. 43-76.
- RAGHUVANSHI S.S., 1969. Cytological evidence bearing on evolution in *Citrus*. *In* : Ist international citrus symposium, p. 207-214.
- SCORA R.W., 1975. On the history and origin of citrus. *In* : Symposium on the biochemical systematics, genetics and origin of cultivated plants. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102 : 369-375.
- SCORA R.W., 1988. Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated citrus. *In* : VIth international citrus congress, p. 277-289.
- SOOST R.K., WILLIAMS T.E., TORRES A.M., 1980. Identification of nucellar and zygotic seedlings with leaf isozymes. *HortScience*, 15 : 728-729.

SWINGLE W.T., REECE P.C., 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives. *In* : The citrus industry. 1. History, world distribution, botany and varieties, W. Reuther *et al.* éd., Berkeley, Etats-Unis, University of California Press, p. 190-430.

TANAKA T., 1961. Citrologia: semi centennial commemoration papers on *Citrus* studies. Osaka, Japon, Citrologia Supporting Foundation, 114 p.

TATUM J.H., BERRY R.E., HEARN C.I., 1974. Characterization of citrus cultivars and separation by thin layer chromatography. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 87 : 75-81.

TORRES A.M., SOOST R.K., DIEDENHOFEN U., 1978. Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. American Journal of Botany, 65 : 869-881.

TORRES A.M., SOOST R.K., MAU-LASTOVICKA T., 1982. Citrus isozymes: genetic and distinguishing nucellar from zygotic seedlings. Journal of Heredity, 73 : 335-339.

WEBBER H.J., 1967. History and development of the citrus industry. *In* : The citrus industry. 1. History, world distribution, botany and varieties, W. Reuther *et al.* éd., Berkeley, Etats-Unis, University of California Press, p. 1-39.