

Détermination des niveaux de ploïdie dans le genre *Actinidia* LINDL. par cytométrie en flux.

P. BLANCHET, S. BROWN, A.-M. HIRSCH,
D. MARIE et K. WATANABE*

DETERMINATION OF PLOIDY LEVEL AMONG THE *ACTINIDIA* LINDL. GENUS BY FLOW CYTOMETRY.

P. BLANCHET, S. BROWN, A.-M. HIRSCH, D. MARIE
and K. WATANABE.

Fruits, May-Jun. 1992, vol. 47, n° 3, p. 451-460.

ABSTRACT - The cytogenetics of *Actinidia* species are difficult by traditional methods because the chromosomes are small and numerous. With flow cytometry it is possible to measure more than one hundred samples per day : this technique gives the 2C value of interphasic nuclei from diverse somatic tissues, which can be assimilated to the ploidy index for a given species. Twelve taxa of the *Actinidia* genus have been studied. The results with flow cytometry of control plants concorded with those from traditional cytogenetics : *A. chinensis* var. *deliciosa* (cultivar Hayward) 2n = 174, *A. polygama* 2n = 58, *A. arguta* 2n = 116. Among *A. arguta* a diploid 2n = 58 and a hexaploid (cultivar Issai) 2n = 174 are confirmed. Among the plants of our botanical collection we have 2C values coherent with *A. chinensis* var. *chinensis* 2n = 58, *A. hemsleyana* 2n = 58, *A. eriantha* 2n = 58, *A. kolomikta* 2n = 58, *A. rufa* 2n = 58, *A. arguta* (several clones) 2n = 116, *A. polygama* 2n = 58 and *A. melanandra* 2n = 116. The cultivars of *A. chinensis* var. *deliciosa* are hexaploid excepted one sterile pentaploid. These results accord with earlier reports. The following species whose chromosome counts are unknown, may be classified by their 2C values as having the following DNA ploidy : *A. callosa* var. *formosana* 2n = 58, *A. arisanensis* 2n = 58, *A. arguta* var. *purpurea* 2n = 116, *A. chinensis* var. *setosa* 2n = 58. Measurements on the leaves of adult vines or vitro-plants and the roots of micro-cuttings or orchard vines of the same clone concord with each other.

DETERMINATION DES NIVEAUX DE PLOIDIE DANS LE
GENRE *ACTINIDIA* LINDL. PAR CYTOMETRIE EN FLUX.

P. BLANCHET, S. BROWN, A.-M. HIRSCH, D. MARIE
et K. WATANABE.

Fruits, May-Jun. 1992, vol. 47, n° 3, p. 451-460.

RESUME - La détermination des nombres de chromosomes dans le genre *Actinidia* LINDL. est délicate par les procédés traditionnels à cause de leur faible taille et de leur grand nombre. La cytométrie en flux permet de réaliser très rapidement ce travail au rythme d'une centaine d'échantillons par jour. Une douzaine de taxons du genre *Actinidia* a été observée en fournissant une valeur 2C de la teneur en ADN des noyaux interphasiques des tissus. Cette technique permet une estimation du niveau de ploïdie. Les résultats des plantes témoins sont en accord avec ceux obtenus par des méthodes cytogénétiques traditionnelles : *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (cultivar Hayward) 2n = 174, *A. polygama* 2n = 58, *A. arguta* 2n = 116. Pour *A. arguta* un diploïde 2n = 58 et l'hexaploïde (cultivar Issai) 2n = 174 sont également confirmés. Parmi les plantes de nos collections nous avons déterminé *A. chinensis* var. *chinensis* 2n = 58, *A. hemsleyana* 2n = 58, *A. eriantha* 2n = 58, *A. kolomikta* 2n = 58, *A. rufa* 2n = 58, *A. arguta* (divers clones) 2n = 116, *A. polygama* 2n = 58, *A. melanandra* 2n = 116. Les cultivars d'*A. chinensis* var. *deliciosa* sont hexaploïdes 2n = 174, sauf un pentaploïde stérile. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie publiée à ce jour. Les espèces suivantes dont les nombres chromosomiques sont inconnus ont été classifiées selon leur valeurs en 2C comme : *A. callosa* var. *formosana* 2n = 58, *A. arisanensis* 2n = 58, *A. arguta* var. *purpurea* 2n = 116 et *A. chinensis* var. *setosa* 2n = 58. Une bonne concordance a été obtenue entre les dosages sur feuilles de plantes adultes et de vitro-plants ainsi que sur les racines de micro-boutures ou de plantes de verger.

INTRODUCTION

Malgré le développement récent de la culture du kiwi, le genre *Actinidia* LINDL. demeure encore peu connu (FERGUSON, 1990 ; BLANCHET et XIAO, 1992).

La systématique du genre notamment dans les taxons proches du kiwi cultivé (*Actinidia chinensis* PLANCH. var. *deliciosa* CHEV.) est éclairée par les différences de nombres chromosomiques (ZHANG et BEUZENBERG, 1983).

Les limites de variabilité génétique (BLANCHET et CHARTIER, 1991) au sein du kiwi cultivé imposeront l'introduction de gènes d'autres espèces pour une meilleure adaptation aux conditions de culture. La connaissance du nombre de chromosomes est alors utile au choix des générateurs lors d'hybridations interspécifiques (WATANABE *et al.*, 1990).

* - P. BLANCHET, Lycée Agricole de Tarn et Garonne, Capou, 82000 MONTAUBAN, France.
S. BROWN, D. MARIE, Cytométrie, Institut des Sciences Végétales, CNRS, 91198 GIF SUR YVETTE, France.
A.-M. HIRSCH, CNRS, Université P. et M. Curie, Laboratoire d'Histophysiologie Végétale, 12, rue Cuvier, 75005 PARIS, France.
K. WATANABE, Junior College, Nihon University, Fujisawa, KANAGAWA 252, Japon.

L'origine de la polyploïdie d'*Actinidia chinensis* PLANCH. var. *deliciosa* CHEV. ($2n = 6x = 174$) n'est pas connue. Le progrès dans la connaissance du niveau de ploïdie des autres espèces permettra de formuler des hypothèses sur sa création à partir des diploïdes, tétraploïdes et hexaploïdes existants. Les études de ce type dans le genre *Prunus* MILL. sur l'origine de *Prunus domestica* L. hexaploïde à partir d'autres *Prunus* diploïdes (SALESSES, 1981) indiquent le potentiel de ce type de travaux pour la création variétale. Les méthodes traditionnelles de comptage des chromosomes sont longues et délicates. Le nombre élevé et la faible taille des chromosomes dans le genre *Actinidia* LINDL. rendent ce travail encore plus fastidieux. Comme chez d'autres espèces la largeur des stomates a été proposée pour la détermination des niveaux de ploïdie, mais avec une fiabilité à vérifier (PRZYWARA *et al.*, 1988).

La cytométrie en flux, par sa grande rapidité, doit permettre d'accélérer ces travaux. Cette technique n'a été que peu employée à ce jour pour les arbres fruitiers (pour le poirier MAERTENS, 1990 ; pour les agrumes OLLITRAULT et MICHAUX-FERRIERE, 1992). L'objectif de l'étude préliminaire présentée ici est de vérifier les possibilités offertes par cette technique pour le genre *Actinidia* LINDL.

Des travaux préliminaires sont engagés à la SRA de Corse sur l'*Actinidia* (OLLITRAULT P. et LEGAVE, communication personnelle, 1991).

NOMBRES CHROMOSOMIQUES CONNUS

Parmi la cinquantaine d'espèces du genre, une dizaine ont déjà été étudiées (tableau 1). La nomenclature botanique retenue pour présenter ces valeurs n'est pas systématiquement celle sous laquelle elles ont été publiées, mais celle qui paraît la plus vraisemblable selon les données les plus récentes de la systématique.

Pour *Actinidia chinensis* et ses variétés nous avons employé provisoirement la nomenclature utilisée par BLANCHET et XIAO (1992) :

- kiwi cultivé hors de Chine (Hayward) : *A. chinensis* PLANCH. var. *deliciosa* CHEV.

- kiwi de Taïwan : *A. chinensis* PLANCH. var. *setosa* LI.

- la plupart des cultivars chinois : *A. chinensis* PLANCH. var. *chinensis*.

Les nombres proposés par différents auteurs suggèrent une série polyploïde avec un nombre de base $x = 29$. Sous réserve de la fiabilité des comptages et des déterminations botaniques, les variations observées indiquent l'existence dans le genre d'une série polyploïde : de diploïde à hexaploïde.

TABLEAU 1 - Nombres de chromosomes des espèces d'*Actinidia* publiés dans la bibliographie.

Espèce	2n	Référence
<i>A. arguta</i>	116	BOWDEN 1940, 1945
"	116	DENG et SEN 1986
"	58	WATANABE 1990
"	116	"
"	174	"
<i>A. arguta</i> var. <i>arguta</i>	116	McNEILAGE et CONSIDINE 1989
<i>A. arguta</i> var. <i>giraldi</i>	58	"
<i>A. callosa</i> var. <i>henryi</i>	58	"
<i>A. callosa</i> var. <i>discolor</i>	58	YAO et CUI 1988
<i>A. chinensis</i> var. <i>chinensis</i>	58	McNEILAGE et CONSIDINE 1989
"	58	ZHANG 1983
"	58	DENG et SEN 1986
<i>A. chinensis</i> var. <i>deliciosa</i>	116	BOWDEN 1940, 1945
"	160	RIZET 1945
"	170	ZHANG et BEUZENBERG 1983
"	174	McNEILAGE et CONSIDINE 1989
"	174	ZHANG 1983
"	174	WATANABE 1990
<i>A. eriantha</i>	58	LU et TAO et PAN 1984
"	58	DENG et SEN 1986
"	58	McNEILAGE et CONSIDINE 1989
<i>A. hemsleyana</i>	58	"
<i>A. kolomikta</i>	58	"
"	112	NAKAJIMA 1942
<i>A. latifolia</i>	58	DENG et SEN 1986
<i>A. macrosperma</i>	116	YAO et CUI 1988
<i>A. melanandra</i>	116	McNEILAGE et CONSIDINE 1989
"	58	NAKAJIMA 1942
"	116	BOWDEN 1940, 1945
<i>A. polygama</i>	58	YAO et CUI 1988
"	58	WATANABE 1990
<i>A. rubricaulis</i>	58	"
<i>A. rufo</i>	58	McNEILAGE et CONSIDINE 1989
<i>A. tetramera</i>	58	YAO et CUI 1988

On peut supposer qu'il s'agit certainement d'autopolyploïdes et d'allopolyplôïdes provenant pour partie d'hybridations et de croisements en retour naturels. La longue durée de vie des plantes et la possibilité de multiplication végétative naturelle par marcottage (BLANCHET, 1991) leur permettent de disposer du temps suffisant pour surmonter parfois les barrières d'isolement naturelles.

MATERIEL VEGETAL UTILISE

Témoins.

En tant que témoins, nous avons utilisé les plantes de la Nihon University à Fujisawa pour la série polyploïde d'*A. arguta* (SIEB. et ZUCC.) PLANCH. ex MIQ. ($2n = 2x = 58$, $2n = 4x = 116$ et Issai $2n = 6x = 174$) et pour *A. polygama* (SIEB. et ZUCC.) MAXIM. ($2n = 58$) dont les nombres chromosomiques publiés par WATANABE (1990) sont parfaitement déterminés. L'*A. arguta* hexaploïde est le cultivar Issai (Issaisarunashi).

L'autre témoin précisément connu par de multiples comptages est le cultivar Hayward ($2n = 6x = 174$) d'*A. chinensis* PLANCH. var. *deliciosa* CHEV. (McNEILAGE et CONSIDINE, 1989).

Autres plantes.

Les autres *Actinidia* testés provenaient soit de plantes en collection au Lycée Agricole de Montauban, soit de vitro-plants en culture au Laboratoire d'Histophysiologie Végétale de l'Université P. et M. Curie. *Actinidia rufa* (SIEB. et ZUCC.) PLANCH. provenait également directement de Fujisawa. Les taxons étudiés appartiennent soit :

- à la section *Leiocarpae* DUNN, constituée de plantes résistantes au froid (BLANCHET, 1989) et d'un intérêt particulier dans les programmes d'amélioration génétique pour les zones tempérées : *arguta*, *kolomikta*, *polygama*, *melanandra*, *rufa*.
- à l'espèce *chinensis* var. *deliciosa* (le cultivar femelle Hayward et d'autres cultivars et semis proches) ou var. *chinensis* et *setosa*. Parmi ce matériel figurent les plants d'origine du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris de l'espèce *A. chinensis* var. *deliciosa* décrits par CHEVALIER (1941), dénommé museum dans les tableaux 2 et 5.
- à des espèces botaniques susceptibles d'être employées comme géniteurs (BLANCHET et XIAO, 1992) : *eriantha*, *hemsleyana*, *callosa* et *arisanensis*.

Organes employés.

Les organes végétaux employés sont des fragments d'environ un cm^2 de jeunes feuilles. Ces jeunes feuilles sont obtenues en forçant sous serre au mois de janvier et février des rameaux dormants d'une dizaine de centimètres pour les plantes issues de verger ou prélevées directement sur les vitro-plants.

Des racines prélevées directement sur les vitro-plants et occasionnellement sur des plants de verger, ou bien culti-

vées *in vitro* en milieu liquide, ont également servi de matériel d'étude.

Référence interne.

La plante utilisée comme référence interne dans chaque mesure est le *Petunia hybrida*, lignée PPC6 ($2n = 2x = 14$; $2C = 2,85$ pg, 41 p. 100 GC).

PRINCIPES DE LA CYTOMETRIE EN FLUX

Le principe de base est de mesurer la fluorescence associée à chaque noyau après extraction et traitement par un fluorochrome se fixant de manière stoechiométrique sur l'ADN (GALBRAITH, 1989 ; BROWN et BERGOUNIOUX, 1989). L'intensité de fluorescence est utilisée comme mesure de l'ADN. La mesure en flux associe ce principe à celui du défilement, un par un, des noyaux cellulaires en suspension à la cadence de centaines ou de milliers de particules par seconde devant un système optique. Ce système optique comprend une source lumineuse et des détecteurs de lumière, qui permettent de quantifier la fluorescence émise par les noyaux. Un microprocesseur gère l'ensemble, convertit les signaux électroniques en signaux numériques, coordonne les données, prépare les représentations graphiques et les analyses statistiques.

Les résultats sont exprimés sous la forme d'un histogramme de l'ADN nucléaire. Dans les cas simples, comme pour les noyaux isolés de feuilles de *Petunia* ou de kiwi, ces histogrammes sont dominés par un pic majoritaire correspondant aux noyaux dérivés de cellules en G0-G1 du cycle prolifération/différenciation, avec une teneur en ADN 2C.

L'interprétation s'appuie sur la position des pics de fluorescence par rapport à une référence connue et stable (dans notre cas *Petunia hybrida*, lignée PPC6, $2n = 2x = 14$ avec $2C = 2,85$ pg d'ADN) et la finesse de ces pics exprimés par son coefficient de variation (CV) (BROWN *et al.*, 1991). En supposant que la population 2C est homogène en ADN, le CV de ce pic dominant est révélateur de la qualité de la mesure, plus il est faible meilleure est la préparation.

La surface des pics, c'est-à-dire le nombre de noyaux, est de peu d'importance pour cette analyse. Des pics mineurs sont évidents sur les figures. Ils correspondent aux noyaux 4C de chaque espèce (sur nos axes logarithmiques, l'écart entre 2C et 4C est de 27 canaux).

Dans ces travaux on assimile le contenu en ADN au nombre de chromosomes et au niveau de ploïdie. Cette assimilation n'est acceptable qu'avec l'essentiel des cellules dans la même phase non proliférante du cycle cellulaire (l'analyse écarte finalement les endorépliquations, cellules en synthèse etc.) et en supposant des chromosomes de tailles voisines parmi les différentes espèces. En toute rigueur, on devrait parler d'index d'ADN assimilable ou non à un niveau de ploïdie. HEDDERMANN *et al.*, (1984) préconisent pour éviter l'ambiguïté l'usage du terme ploïdie en ADN (DNA ploidy).

METHODE UTILISEE

Les mesures ont été réalisées sur un cytomètre EPICS V (Coultronics France) avec laser Argon 2025-05 (Spectra-Physics) réglé sur 100 mW à 351+354 nm.

La méthode pour extraire les noyaux et les marquer au fluorochrome est détaillée dans BROWN *et al.* (1991). Un morceau de feuille d'environ 1 cm² (en évitant les vascularisations majeures) de l'échantillon d'*Actinidia* et du témoin *Petunia* sont placés ensemble dans une boîte de Pétri et recouverts de 500 microlitres de tampon froid (4°C). Ces morceaux sont immédiatement hachés finement avec une lame de rasoir, puis l'ensemble de la suspension est filtré (30 micromètres) et placé dans un tube d'analyse du cytomètre. Le tampon est celui de GALBRAITH *et al.* (1983) additionné de 5 µl/ml de β-mercaptoéthanol.

La formation de « fils » laiteux dans la préparation est très néfaste ; en réduisant la quantité de tissus employés, on limite cette difficulté. L'emploi de tissus de racines réduit également ces interférences.

Des solutions mères des fluorochromes sont préparées dans l'eau distillée à 1 mg/ml : bisbenzimidazole Hoechst 33342 et DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride), tous deux d'Aldrich Chimie (Strasbourg), bromure d'éthidium (Sigma, St Louis). Elles se conservent ainsi des années à -20°C, des mois à 4°C. Soit l'Hoechst, soit le DAPI est ajouté sur les noyaux à une concentration finale de 5 µg/ml. La coloration spécifique des liaisons A-T est stable après une à deux minutes. Ces colorants sont peu chers, mais nécessitent une source en ultraviolet sur le cytomètre. L'émission bleue est recueillie entre 408 et 530 nm.

Le marquage avec le colorant intercalant de l'ADN, bromure d'éthidium, est plus fastidieux par la nécessité d'un prétraitement de la suspension à la ribonucléase pour éviter une interaction ARN-colorant. On prépare un stock de ribonucléase A (RNase Réf. 111915 de Boehringer Mannheim) en solution à 1 p. 100 dans 12 g/l Tris, 6 g/l NaCl et 100 g/l glycérol à pH 7,6, solution ayant ainsi 500 unités d'activité par ml. Cette solution est portée à ébullition 20 minutes pour inactiver d'éventuels désoxynucléases contaminantes et stockée à -20° en petites aliquotes. On ajoute 10 µg/ml de cette solution RNase sur le filtrat après la coupe, avec 50 µg/ml de bromure d'éthidium. Après 20 minutes à température ambiante, l'échantillon est analysé. Le traitement à la RNase est seulement nécessaire pour une quantification précise de la valeur 2C. Dans un criblage rapide de ploïdie on peut supprimer cette étape mais l'attente de 20 minutes demeure nécessaire. Le bromure d'éthidium est excité en lumière U.V. ou visible. L'émission est recueillie au-delà de 570 nm. Pour minimiser l'interférence éventuelle de la fluorescence de la chlorophylle, on peut augmenter la concentration de Triton-X 100 dans le tampon à 0,4 p. 100 (poids/volume).

Chaque histogramme correspond à environ 5000 noyaux. La position des pics est toujours exprimée en canaux (sur une échelle 0-255), mais en parallèle on accumule des données d'intensité avec amplification soit linéaire soit logarithmique. Cette dernière méthode est intéressante pour représenter des échantillons de ploïdie assez variée. Dans le travail présenté, le CV de *Petunia* (en échelle linéaire) était régulièrement de 3,0-3,5 p. 100 et celui d'*Actinidia*

dia spp. de 2,7-6,0 p. 100 avec une moyenne de 3,5 p. 100.

Les mesures sont, sauf dans quelques rares cas, la moyenne de 5 échantillons de feuilles provenant de même plante. La méthode est extrêmement rapide. Une équipe de 5 personnes a pu mesurer une centaine d'échantillons par jour sans difficulté particulière. En analyse de routine ce rendement peut être multiplié par trois.

RESULTATS

Plantes témoins.

La synthèse des résultats est présentée dans les tableaux 2 à 5. Pour chaque échantillon analysé la position relative de son pic de fluorescence dans l'histogramme est exprimée par rapport à celle du pic de fluorescence de la référence interne *Petunia*. Pour les échantillons les plus représentatifs les histogrammes de répartition de l'intensité de fluorescence sont présentés de la figure 1 à 3.

Pour les *Actinidia* témoins, les estimations d'ADN nucléaire sont dans des rapports correspondant effectivement aux niveaux de ploïdie connus. Avec Hoechst 33342, les rapports de position de leurs pics relativement à celui de *Petunia* sont 0,60, 1,74 et 1,71 respectivement pour un diploïde (*A. arguta* 2n = 2x = 58), un hexaploïde (Issai 2n = 6x = 174) et un autre hexaploïde (Hayward 2n = 6x = 174). Les résultats avec DAPI sont, comme attendu, très semblables : 0,59, 1,22 et 1,72 respectivement pour un diploïde (*A. polygama* 2n = 2x = 58), un tétraploïde (*A. arguta* 2n = 4x = 116) et un hexaploïde (Hayward 2n = 6x = 174). Ces valeurs sont elles-mêmes dans des proportions proches de celles attendues selon les niveaux de ploïdie : 3 pour hexaploïde/diploïde (valeur expérimentale 2,91 = 1,72/0,59), 2 pour tétraploïde/diploïde (valeur expérimentale 2,06 = 1,22/0,59).

Par contre les rapports obtenus avec le colorant intercalant bromure d'éthidium sont d'environ 14 p. 100 inférieurs à ceux observés avec les colorants des A-T, Hoechst ou DAPI : pour Hayward 1,47 contre 1,71 (Hoechst) et 1,72 (DAPI). Cet écart s'explique par la différence de teneur en A-T des ADN des deux espèces (la référence interne *Petunia* et l'*Actinidia*). Cette différence va moduler les intensités relatives de fluorescence observées avec des colorants spécifiques aux bases A-T en plus de la différence de quantité d'ADN (GODELLE *et al.*, 1992).

Ainsi, pour calculer la quantité d'ADN en pg on doit se limiter à un colorant intercalant dont le rapport d'intensité relatif à une référence interne est indépendant de leur composition en bases AT/GC. Pour Hayward, le rapport de 1,47 pour bromure d'éthidium avec *Petunia* correspond donc à 6x = 2C = 4,19 pg d'ADN (1,47 x 2,85 pg = 4,19 pg).

Par contre, l'écart entre mesures avec un colorant intercalant d'ADN et des colorants spécifiques à certaines bases permet d'après GODELLE *et al.* (1992) de calculer la composition en bases, en connaissant la composition de la référence (*Petunia* est 41,0 p. 100 GC). Hayward est ainsi calculé à 38,7 p. 100 GC.

Dans le cas d'*A. chinensis* var. *deliciosa* il n'est pas noté

TABLEAU 2 - Rapport de la valeur 2C d'*Actinidia* spp. relative au 2C de *Petunia* avec le fluorochrome Hoechst 33342.

ADN relatif <i>Actinidia/Petunia</i>	taxon d' <i>Actinidia</i>	niveau de ploïdie probable
0,52	<i>kolomikta</i>	diploïde 2n = 58
0,51	<i>kolomikta</i> (microbouture)	
0,56	<i>polygama</i>	
0,57	<i>polygama</i> (microbouture)	
0,57	<i>arisanensis</i>	
0,57	<i>eriantha</i>	
0,58	<i>chinensis</i> var. <i>chinensis</i>	
0,58	<i>hemsleyana</i>	
0,60	<i>chinensis</i> var. <i>setosa</i>	
0,60	<i>arguta</i> (2n = 2x = 58 témoin)	
0,62	<i>callosa</i> var. <i>formosana</i>	
1,20	<i>arguta</i> divers clones	tétraploïde 2n = 116
1,19	<i>arguta</i> div. clones (microbouture)	
1,21	<i>arguta</i> var. <i>purpurea</i>	
1,21	<i>melanandra</i>	
1,15	<i>melanandra</i> (microbouture)	
1,74	<i>arguta</i> Issai (2n = 6x = 174, témoin)	hexaploïde 2n = 174
1,71	<i>chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> Hayward (2n = 6x = 174, témoin)	
1,71	<i>chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> Hayward, microbouture (2n = 6x = 174, témoin)	
1,71	<i>chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> museum (<i>in vitro</i>)	
1,76	<i>chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> museum (racines <i>in vitro</i>)	
1,78	<i>chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> tomuri (microbouture)	

TABLEAU 3 - Rapport de la valeur 2C d'*Actinidia* spp. relative au 2C de *Petunia* avec le fluorochrome DAPI.

ADN relatif <i>Actinidia/Petunia</i>	taxon d' <i>Actinidia</i>	niveau de ploïdie probable
0,59	<i>polygama</i> (2n = 2x = 58, témoin)	diploïde 2n = 58
0,61	<i>rufa</i>	
1,72	<i>chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> Hayward (2n = 6x = 174, témoin)	hexaploïde 2n = 174
1,22	<i>arguta</i> (2n = 4x = 116, témoin)	tétraploïde 2n = 116
1,45	<i>chinensis</i> var. <i>delicioca</i> semis à phénotype anormal	pentaploïde 2n = 145

TABLEAU 4 - Rapport de la valeur 2C d'*Actinidia* spp. relative au 2C de *Petunia* avec le fluorochrome bromure d'éthidium.

ADN relatif <i>Actinidia/Petunia</i>	taxon d' <i>Actinidia</i>	niveau de ploïdie probable
1,47	<i>chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> Hayward (2n = 6x = 174, témoin)	hexaploïde 2n = 174
1,52	<i>arguta</i> Issai (2n = 6x = 174, témoin)	
0,47	<i>kolomikta</i>	diploïde 2n = 58
0,50	<i>chinensis</i> var. <i>chinensis</i>	
0,51	<i>chinensis</i> var. <i>setosa</i>	

TABLEAU 5 - Valeurs 2C en pg d'ADN déterminées d'après le bromure d'éthidium, et composition du génome en bases (exprimée en GC et calculée d'après GODELLE *et al.*, 1992) pour 7 taxons d'*Actinidia* spp. mesurés par cytométrie de flux relativement à *Petunia hybrida*.

taxon d' <i>Actinidia</i>	2C (pg)	Composition (GC p. 100)
<i>kolomikta</i>	1,34	41,4
<i>polygama</i>	1,40	40,8
<i>chinensis</i> var. <i>setosa</i>	1,45	39,0
<i>arguta</i> var. <i>purpurea</i>	2,85	38,1
<i>melanandra</i>	2,85	38,0
<i>chinensis</i> var. <i>deliciosa</i> (Hayward, témoin 2n = 6x = 174)	4,19	38,7
<i>arguta</i> , témoin (Issai 2n = 6x = 174)	4,33	38,9

de différence sensible entre les cultivars mâles (Tomuri 1,78) et femelles (Hayward 1,71, Museum 1,71 et 1,76). Pour *arguta* et *kolomikta* il n'a pas été observé d'écarts. Pour les autres espèces dont la ploïdie était inconnue, le jeune âge des plants ne permet pas encore de connaître leur sexe. Les résultats ne donnent pas d'information sur l'existence éventuelle d'hétérochromosomes.

La confirmation de la nature hexaploïde du cultivar Issai nous a conduit à l'observer plus précisément sur le terrain. En fait il présente une pilosité discrète sur les sépales et les jeunes tiges qui n'est pas caractéristique d'*A. arguta*. Par contre la comparaison des protoplastes préparés à partir de mésophylle foliaire d'*A. arguta*, d'*A. arguta* var. *purpurea* et d'*A. arguta* « Issai », montre une grande similitude en ce qui concerne leur taille et celle de leur chloroplastes ; alors que les protoplastes préparés à partir de mésophylles foliaires d'*A. chinensis* var. *deliciosa* (Hayward) sont deux fois plus grands (DERAMBURE et HIRSCH, 1992). Il en est de même en ce qui concerne la composition en monosaccharides des mucilages. Le fucose et le xylose sont présents chez les *arguta* et absents chez *deliciosa*. En fait seule une analyse isoenzymatique comparative d'*A. arguta* et d'*A. arguta* « Issai » permettra de connaître leur relation taxonomique.

Autres espèces.

Pour les autres plantes figurant dans les collections du Lycée Agricole, les résultats sont présentés dans les tableaux 2 à 4, et dans les figures 1 à 3.

Pour les espèces évaluées par de précédents auteurs, les degrés de ploïdie probables d'après nos résultats sont conformes à ceux publiés dans la bibliographie :

- diploïdes, 2n = 2x = 58 :

A. kolomikta (MAXIM. et RUPR.), MAXIM., *A. polygama* (SIEB. et ZUCC.) MAXIM., *A. hemsleyana* DUNN, *A. eriantha* BENTH., *A. rufa* (SIEB. et ZUCC.) PLANCH, *A. chinensis* PLANCH. var. *chinensis*.

- tétraploïdes, 2n = 4x = 116 :

A. arguta (SIEB. et ZUCC.) PLANCH. ex MIQ., *A. melanandra* FRANCH.

- hexaploïdes, 2n = 6x = 174 :

A. chinensis PLANCH. var. *deliciosa* CHEV.

Les plants mâles et femelles de la var. *deliciosa* se sont tous révélés hexaploïdes.

Un cas particulier a été observé. Un individu issu d'un semis de Hayward librement pollinisé par la même variété botanique, obtenu par M. GALIBERT (*), possède un phénotype déviant (feuille 2 à 3 fois plus larges que Hayward et gaufrées) et n'a jamais produit de fleurs. Cette plante s'est révélée pentaploïde (figure 2 et tableau 4).

Pour les espèces dont le niveau de ploïdie était inconnu à ce jour les degrés de ploïdie probables d'après nos mesures sont :

- diploïdes, 2n = 2x = 58 :

A. arisanensis HAYATA, *A. callosa* LINDL. var. *formosana* FINET et GAGNEP, *A. chinensis* PLANCH. var. *setosa* LI.

- tétraploïde, 2n = 4x = 116 :

A. arguta (SIEB. et ZUCC.) PLANCH. ex MIQ. var. *purpurea* REHD.) C.F. LIANG.

Le statut diploïde d'*Actinidia chinensis* PLANCH. var. *setosa* LI est le résultat le plus intéressant et surprenant. D'après sa morphologie (BLANCHET, 1991) on aurait pu penser que cette espèce très proche du kiwi cultivé (*Actinidia chinensis* PLANCH. var. *deliciosa* CHEV.) serait également hexaploïde.

(*) - GALIBERT Alfred, Saint Christol, 34000 LUNEL.

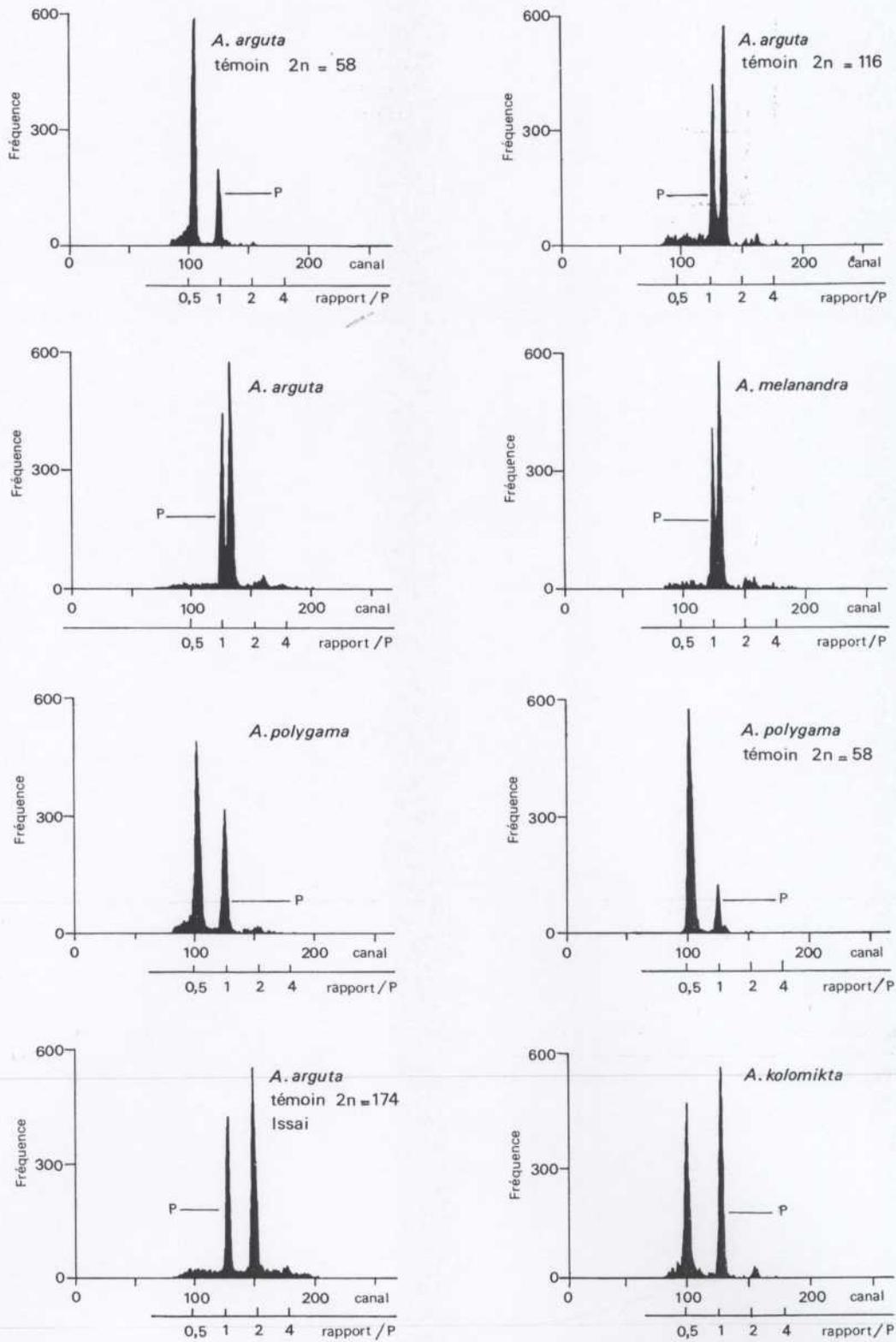


FIGURE 1 - Histogramme des intensités de fluorescence de 5000 noyaux isolés ensemble de *Petunia hybrida* (référence interne, P) et d'*Actinidia* spp. de la section *Leiocarpae* après marquage avec bisbenzimidazole Hoechst 33342. L'abscisse est de 256 canaux après amplification logarithmique à 3 ordres.

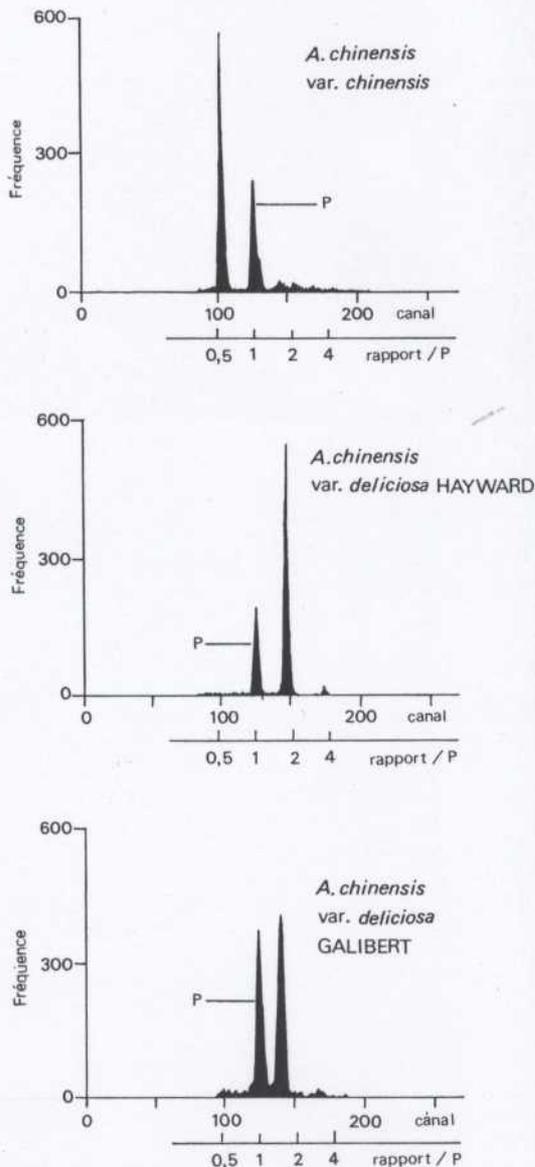


FIGURE 2 - Histogramme des intensités de fluorescence de 5000 noyaux isolés ensemble de *Petunia hybrida* (référence interne, P) et de 3 taxons d'*Actinidia chinensis* après marquage avec bisbenzimidazole Hoechst 33342. L'abscisse est de 256 canaux après amplification logarithmique à 3 ordres.

Selon les organes étudiés.

Il y a bonne concordance entre les résultats obtenus sur feuille et sur racine. Ce point est important car parfois les mesures sur les feuilles sont délicates du fait des interférences entre les produits secondaires extraits des feuilles et le fluorochrome malgré la diversité des tampons (tableau 2 pour *A. chinensis* var. *deliciosa*). De même il y a concordance entre les résultats obtenus sur feuilles de vitro-plants et de plantes adultes (tableau 2).

Valeurs 2C et composition en bases.

A partir des rapports mesurés avec le bromure d'éthidium, nous avons calculé les valeurs 2C pour 7 taxons. En confrontant les rapports avec bromure d'éthidium et bisbenzimidazole Hoechst 33342, nous avons calculé la composition en bases, exprimée en GC (tableau 5).

CONCLUSIONS

L'accord entre ces présents résultats et les valeurs obtenues par des méthodes cytogénétiques traditionnelles confirme l'intérêt de la cytométrie en flux pour la détermination des niveaux de ploïdie dans le genre *Actinidia*.

En revanche la cytométrie de flux ne fournit évidemment ni d'informations sur le nombre exact de chromosomes (mais sur l'estimation de leur quantité d'ADN assimilée au nombre de chromosomes) ni sur les associations de chromosomes à la méiose (LU *et al.*, 1984, WATANABE *et al.*, 1992), qui ne peuvent être observées que par des techniques de microscopie traditionnelles.

Sur la quinzaine d'espèces dont le nombre chromosomique est désormais connu, l'hexaploïdie du kiwi cultivé (*A. chinensis* PLANCH. var. *deliciosa* CHEV.) paraît l'exception (avec le cultivar Issai). La diploïdie paraît la situation la plus fréquente. Les individus tétraploïdes observés d'*A. arguta* et *melanandra* sont fertiles dans nos collections. Cette fertilité est probablement due à une nature allopolyploïde, qui permet de surmonter la faible fertilité des autopolyploïdes. On ne peut exclure le fait que les individus observés soient des plantes d'Arboretum déjà issues d'hybridations interspécifiques.

Il est désormais possible de traiter rapidement et à moindre coût les nombreuses espèces d'*Actinidia* encore mal connues. L'analyse systématique de la ploïdie de plantes spontanées croissant dans leur milieu naturel, des plantes de nos collections et des espèces non encore étudiées est à poursuivre. Elle devrait faciliter la compréhension de la phylogénie du genre *Actinidia* et la création d'individus synthétiques nouveaux.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Pr. Cheng-Chun NEE de la National Chung Hsing University de Taïwan, le Dr. Shyi-Kuan OU du Taïwan Agricultural Research Institute et le Dr. Peter DEL TREDICI de l'Arnold Arboretum de la Harvard University pour la fourniture de matériel végétal, D. FORTUNE et A. DERAMBURE pour l'aide apportée dans les manipulations de cytométrie de flux, ainsi que les établissements SALLE-PROUST pour la fourniture de micro-boutures de Hayward et Tomuri.

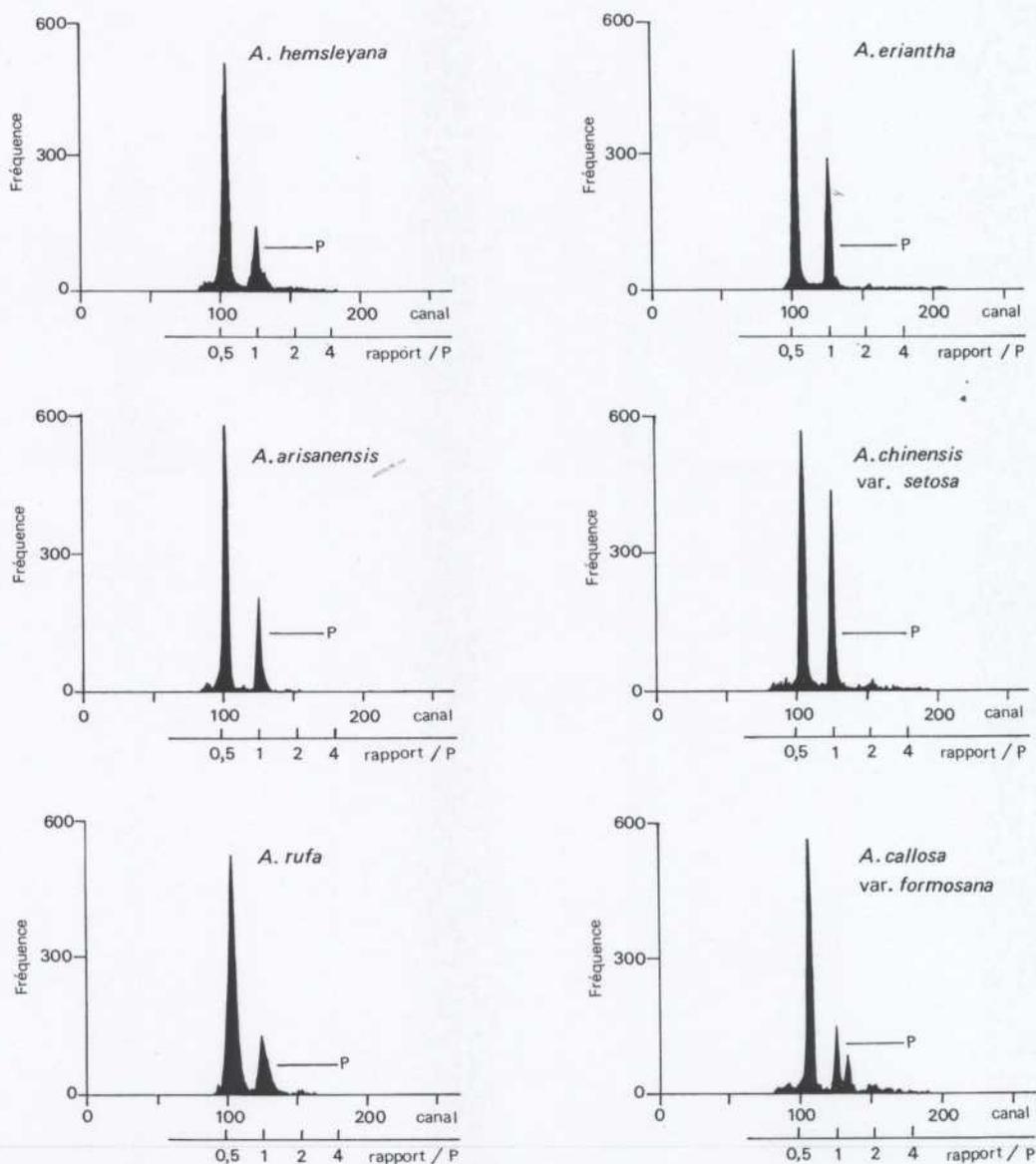


FIGURE 3 - Histogramme des intensités de fluorescence de 5000 noyaux isolés ensemble de *Petunia hybrida* (référence interne, P) et de 6 taxons différents d'*Actinidia* après marquage avec bisbenzimidé Hoechst 33342. L'abscisse est de 256 canaux après amplification logarithmique à 3 ordres.

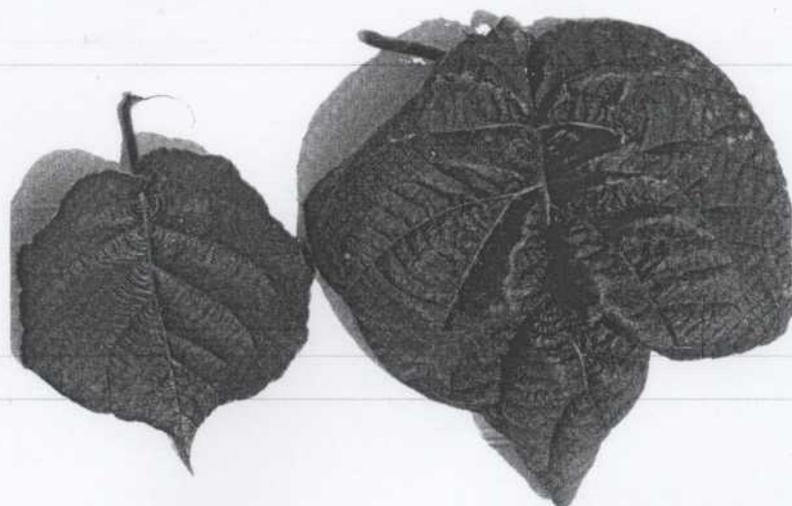


FIGURE 4 - Feuilles d'*Actinidia chinensis* PLANCH. var. *deliciosa*. A gauche cultivar Hayward ($2n = 174$). A droite pentaploïde ($2n = 145$) d'origine GALIBERT à phénotype anormal.

BIBLIOGRAPHIE

- BLANCHET (P.). 1989.
Description et comportement d'espèces d'*Actinidia* à fruits glabres dans le Sud-Ouest de la France.
Fruits, 44 (10), 543-552.
- BLANCHET (P.). 1991.
Actinidia chinensis PLANCH. var. *setosa* LI dans son habitat spontané à Taïwan.
Fruits, 46 (1), 67-73.
- BLANCHET (P.) and CHARTIER (J.). 1991.
Genetic variability among the progeny of Hayward kiwifruit.
Acta Horticulturae, vol. 297, 87-92.
- BLANCHET (P.) et XIAO (X.G.). 1992.
Potentialités agronomiques et caractères taxonomiques dans le genre *Actinidia* LINDL.
Fruits, 47 (1), 65-80.
- BOWDEN (W.M.). 1940.
The chromosome complements and its relationship to cold resistance in higher plants.
Chro. Bot., 6, 123-125.
- BOWDEN (W.M.). 1945.
A list of chromosome numbers in higher plants.
I. Acanthaceae to Myrtaceae.
Amer. J. Bot., 32, 81-92.
- BROWN (S.C.), BERGOUNIOUX (C.), TALLET (S.) and MARIE (D.). 1991.
Flow cytometry of nuclei for ploidy and cell cycle analysis.
Chpt. 5.3. in : *A laboratory guide for cellular and molecular plant biology*, I. Negrutiu et G. Gharti-Chhetri (eds). Birkhäuser, Basel.
- BROWN (S.C.), DEVAUX (P.), MARIE (D.), BERGOUNIOUX (C.) et PETIT (P.X.). 1991.
Analyse de la ploïdie par cytométrie de flux.
Biofutur, 105 (octobre), Technoscope 47.
- BROWN (S.C.) and BERGOUNIOUX (C.). 1989.
Plant flow cytometry,
in : *Flow cytometry advanced research and clinical applications*. vol. II, 195-220, Ed. Yen A., CRC Press, Boca Raton, Florida.
- CHEVALIER (A.). 1941.
Un *Actinidia* à fruits comestibles intéressant pour la France : *Actinidia chinensis* PLANCH. var. *deliciosa* CHEV.
Rev. Bot. Appl. et d'Agr. trop.(2), 240-244.
- DENG (X.X.) and SEN (H.M.). 1986.
Studies on the chromosomes numbers of *Actinidia*.
Acta Hort. Sinica, 13 (2), 80 (en chinois).
- DERAMBURE (A.) et HIRSCH (A.M.). 1992.
Résultats non publiés.
- FERGUSON (A.E.). 1990.
Kiwifruit (*Actinidia*). Genetic resources of temperate fruit and nut crops.
Acta Horticulturae, vol. 290-XIII, 603-653.
- GALBRAITH (D.W.). 1989.
Analysis of higher plants by flow cytometry and cell sorting.
Int. Rev. Cytology, 116, 165-228.
- GODELLE (B.), CARTIERE (B.), MARIE (D.), BROWN (S.C.) and SILJAK-YAKOVLEV (S.). 1992.
A heterochromatin study reveals non-linearity of fluorometry for genomic base composition.
(en cours de publication).
- HIDDERMANN (W.), SCHUMANN (J.), ANDREEFF (M.), BARLOGIE (B.), HERMAN (C.), LEIF (R.C.), MAYALL (R.H.), MURPHY (R.F.) and SANDBERG (A.A.). 1984.
Convention on nomenclature for DNA cytometry.
Cytometry 5, 445-446.
- LU (L.X.), TAO (M.C.) and PAN (Y.X.). 1984.
Observations on the chromosomes and meioses of pollen mother cells in *Actinidia eriantha* Benth.
Fujian Nongxueyuan Xuebao, 13, 25-30 (en chinois).
- MAERTENS (P.). 1990.
Les nouvelles variétés de poires belges : des mutants diploïdes ?
Le Fruit Belge, (431), 217-222.
- McNEILAGE (M.A.) and CONSIDINE (J.A.). 1989. *
Chromosome studies in some *Actinidia* taxa and implications for breeding.
New Zealand J. Bot., 27, 71-81.
- NAKAJIMA (G.). 1942.
Cytological studies in some flowering dioecious plants, with special reference to the sex chromosome.
Cytologia, 12, 262-270.
- 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, 195-203.
- PRZYWARA (L.), PANDY (K.K.) and SANDERS (P.M.). 1988.
Length of stomata as an indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa*.
New Zealand J. of Bot., 26, 179-182.
- RIZET (G.). 1945.
Contribution à l'étude biologique et cytologique de l'*Actinidia chinensis*.
C.R. Société de Biologie, 139, 140-142.
- SALESSES (G.). 1981.
Hybridation interspécifique et cytologie chez les pruniers.
Premier colloque sur les recherches fruitières, Bordeaux 1981, 121-128.
- WATANABE (K.), TAKAHASHI (B.) and SHIRATO (K.). 1990.
Chromosome numbers in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) and related species.
J. Japan Soc. Hort. Sci., 58 (4), 835-840.
- WATANABE (K.), SHIRATO (K.) and TAKAHASHI (B.). 1992.
Pollen degeneration in pistillate cultivar of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*).
J. of Jap. Soc. for Hort. Science, 60 (4), 777-784.
- YAO (J.L.) and CUI (Z.X.). 1988.
Observation on the chromosome number of species of *Actinidia*.
J. of Fruit Science, 5 (1), 24-25 (en chinois).
- ZHANG (Z.Y.). 1983.
Rapport sur le nombre de chromosome de deux variétés d'*Actinidia chinensis* PLANCH.
Acta Phytotaxonomica sinica, 21, 161-163 (en chinois).
- ZHANG (J.) and BEUZENBERG (E.J.). 1983.
Chromosome numbers in two varieties of *Actinidia chinensis* PLANCH.
New Zealand J. Bot., 21, 353-355.

DETERMINACION DE LOS NIVELES DE PLOIDIA EN EL GENERO *ACTINIDIA* LINDL. POR MEDIO DE CITOMETRIA DE FLUJO.

P. BLANCHET, S. BROWN, A.-M. HIRSCH, D. MARIE y K. WATANABE.

Fruits, May-Jun. 1992, vol. 47, nº 3, p. 451-460.

RESUMEN - La determinación del número de cromosomas en el género *Actinidia* LINDL. es muy delicado siguiendo los procedimientos tradicionales, debido a su reducido tamaño y a su gran número. La citometría de flujo permite realizar muy rápidamente este trabajo con un ritmo de una centena de muestras por día. Una docena de taxones del género *Actinidia* fue estudiado obteniéndose un valor 2C del contenido de ADN de los núcleos interfásicos de los tejidos. Esta técnica permite una estimación del nivel de ploïdia. Los resultados de las plantas testigo coinciden con los obtenidos por medio de los métodos citogenéticos tradicionales : *Actinidia chinensis* var. *deli-*

ciosa (cultivar Hayward) 2n = 174, *A. polygama* 2n = 58, *A. arguta* 2n = 116. Para *A. arguta* un diploide 2n = 58 y el hexaploide (cultivar Issai) 2n = 174 están igualmente confirmados. Dentro de las plantas de nuestras colecciones determinamos *A. chinensis* var. *chinensis* 2n = 58, *A. hemsleyana* 2n = 58, *A. eriantha* 2n = 58, *A. kolomikta* 2n = 58, *A. rufa* 2n = 58, *A. arguta* (varios clones) 2n = 116, *A. polygama* 2n = 58, *A. melanandra* 2n = 116. Los cultivares de *A. chinensis* var. *deliciosa* son hexaploides 2n = 174, excepto un pentaploide estéril. Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía publicada hasta el momento. Las especies siguientes, en las cuales los números cromosómicos son desconocidos, fueron clasificadas según sus valores en 2C como : *A. callosa* var. *formosana* 2n = 58, *A. arisanensis* 2n = 58, *A. arguta* var. *purpurea* 2n = 116 y *A. chinensis* var. *setosa* 2n = 58. Se obtuvo una buena concordancia entre las medidas realizadas sobre hojas de plantas adultas y plantas *in vitro*.