

# Etude critique de la technique de cytométrie en flux appliquée à l'amélioration des plantes : Résultats obtenus pour quelques agrumes.

P. OLLITRAULT et Nicole MICHAUX-FERRIERE\*

**A CRITICAL STUDY OF THE TECHNIQUE OF FLOW CYTOMETRY APPLIED TO PLANT BREEDING : RESULTS ACHIEVED FOR SOME CITRUS SPECIES.**

P. OLLITRAULT et Nicole MICHAUX-FERRIERE.

*Fruits*, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 195-203.

**ABSTRACT** - Flow cytometry aims to analyse isolated cells or nuclei that are streamlined into a liquid flow. This technique which is extensively developed for medical purposes gives an accurate measure of cellular or nuclear volumes or of fluorescence in specific experimental conditions. When fluorescent labeling is selective of a given substance, for instance DNA, a quantitative analysis can be implemented. The major advantages of this technique are the following : high speed of the analysis ( $10^3$  to  $10^6$  events per minute), the possibility of an *in vivo* cellular screening, the assessment in a given population of the amount of DNA or RNA, and finally the possibility of a multiparametric analysis.

Our recent experience<sup>1</sup> has shown that two main results can be obtained with a good reliability.

1. The level of ploidy of a plant sample can be quickly evaluated, if the control deals with the same genome of a known ploidy.

2. The relative genomic size of a group of genotypes, species, genera or families can be estimated and compared. By introducing into the system a control of known genomic size one can determine the DNA content (pg) of the analysed genome.

The analysis of sixty citrus cultivars of the Corsican collection enabled us to confirm the diploidy of most *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus* and *Eremocitrus*. However the tetraploidy of three different *Poncirus* was uncovered, and the triploidy of Tahiti lime was confirmed. The genomic size seems also to vary among the different *Citrus* specie and between the different species of *Citropsis*.

## LA CYTOMETRIE EN FLUX : PRINCIPES ET LIMITES D'APPLICATION

### Définition.

La cytométrie en flux (CMF) est une technique d'analyse de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Elle permet le comptage des cellules ainsi qu'une mesure individuelle de volume ou d'intensité de fluorescence. Si la fluorescence acquise est spécifique d'une substance donnée (ADN par exemple), et si l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de cette substance, des mesures quantitatives peuvent être envisagées.

\* - OLLITRAULT - CIRAD-IRFA - San Giuliano, 20230 San Nicolao (Corse).  
MICHAUX-FERRIERE - CIRAD-BIOTROP - B.P. 5035 - 34032 Montpellier Cedex.

**ETUDE CRITIQUE DE LA TECHNIQUE DE CYTOMETRIE EN FLUX APPLIQUEE A L'AMELIORATION DES PLANTES : RESULTATS OBTENUS POUR QUELQUES AGRUMES.**

P. OLLITRAULT et Nicole MICHAUX-FERRIERE.

*Fruits*, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 195-203.

**RESUME** - La cytométrie en flux est une méthode d'analyse de cellules ou de noyaux isolés, entraînés par un flux liquide. Cette technique largement utilisée dans le domaine médical permet, dans des conditions expérimentales données, des mesures de volume (cellulaire ou nucléaire), et de fluorescence. Lorsque le marquage fluorescent réalisé est spécifique d'une substance (ADN par exemple), une analyse quantitative peut être envisagée. La rapidité d'analyse ( $10^3$  à  $10^6$  événements/mn), la possibilité de tri cellulaire en conditions vitales, la détermination dans une population donnée de la distribution d'un paramètre étudié (quantité d'ADN, quantité d'ARN) enfin le pouvoir de réaliser une analyse multiparamétrique sont les atouts majeurs de cette technique. Compte tenu de l'expérience toute récente et encore limitée du laboratoire, deux types de résultats peuvent être obtenus de façon fiable.

1. Le niveau de ploïdie d'un échantillon donné peut être rapidement révélé.

2. La taille relative du génome d'une série de génotypes, d'espèces, de genres ou de familles peut être appréciée et comparée.

L'introduction dans l'analyse d'un génome de taille connue permet de déterminer le contenu réel en ADN (pg) du génome étudié.

L'analyse d'une soixantaine d'agrumes de la collection de Corse a permis de confirmer la diploïdie de la quasi-totalité des *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus* et *Eremocitrus* envisagés. Toutefois, trois *Poncirus* tétraploïdes ont été identifiés et la triploïdie du limetier Tahiti a été vérifiée. Il semble, par ailleurs, exister une variation de la taille du génome entre certaines espèces du genre *Citrus* ainsi qu'entre les espèces du genre *Citropsis*.

Cette méthode est largement utilisée dans le domaine médical depuis 20 ans ; elle a été progressivement mise au point depuis les premiers essais effectués en 1934, en intégrant à mesure les progrès réalisés concernant :

- les sources lumineuses d'excitation (qui sont actuellement des lasers à argon),

- les fluorochromes capables de traduire spécifiquement des propriétés et des fonctions cellulaires de plus en plus nombreuses,

- l'informatique qui a été déterminante dans l'exploitation des résultats.

Les atouts essentiels de cette technique sont la rapidité d'analyse ( $10^3$  à  $10^6$  événements par minute) et la possibi-

lité de réaliser des mesures quantitatives uni ou multiparamétriques. Un tri cellulaire en fonction de critères préalablement définis (volume, intensité de coloration) est envisageable, même en conditions vitales.

Dans une population hétérogène, la cytométrie définit la variation et la distribution d'un caractère donné alors que les méthodes biochimiques évaluent les caractéristiques d'une cellule moyenne (qui peut-être n'existe pas !).

#### Principe technique.

La figure 1 présente schématiquement le mode de fonctionnement d'un cytomètre.

Les cellules isolées, mises en suspension sont soumises à une surpression qui leur permet de progresser et de parvenir à une veine liquide d'entraînement. Les cellules défilent (10 m/s), elles sont interceptées par un faisceau de lumière excitatrice incidente et de ce fait comptées. En réponse, la cellule émet un certain nombre de signaux optiques qui

sont guidés par des miroirs dichroïques et des filtres vers des photomultiplicateurs. Les paramètres mesurés (la fluorescence est le paramètre le plus étudié en CMF) sont sous forme de signaux optiques ou électriques dont l'intensité est corrélée à des propriétés cellulaires.

Avec cet appareil, un tri cellulaire peut s'effectuer en chargeant positivement ou négativement les sous-populations recherchées ayant des caractéristiques données. Elles seront déviées de leur trajectoire en passant dans un champ électrique et guidées vers des flacons séparés.

Sur l'ensemble des événements analysés qui sont matérialisés par des points sur l'écran, l'utilisateur définit, à l'aide de fenêtres, une population qui seule est prise en compte (figure 2). A l'intérieur de la fenêtre, les événements sont considérés comme valides, à l'extérieur ils sont ignorés. La définition de cette fenêtre est donc très importante pour l'interprétation des résultats. Elle permet l'élimination hors de la population étudiée des débris et des doublés. Les résultats sont exprimés sous forme d'histogrammes présen-

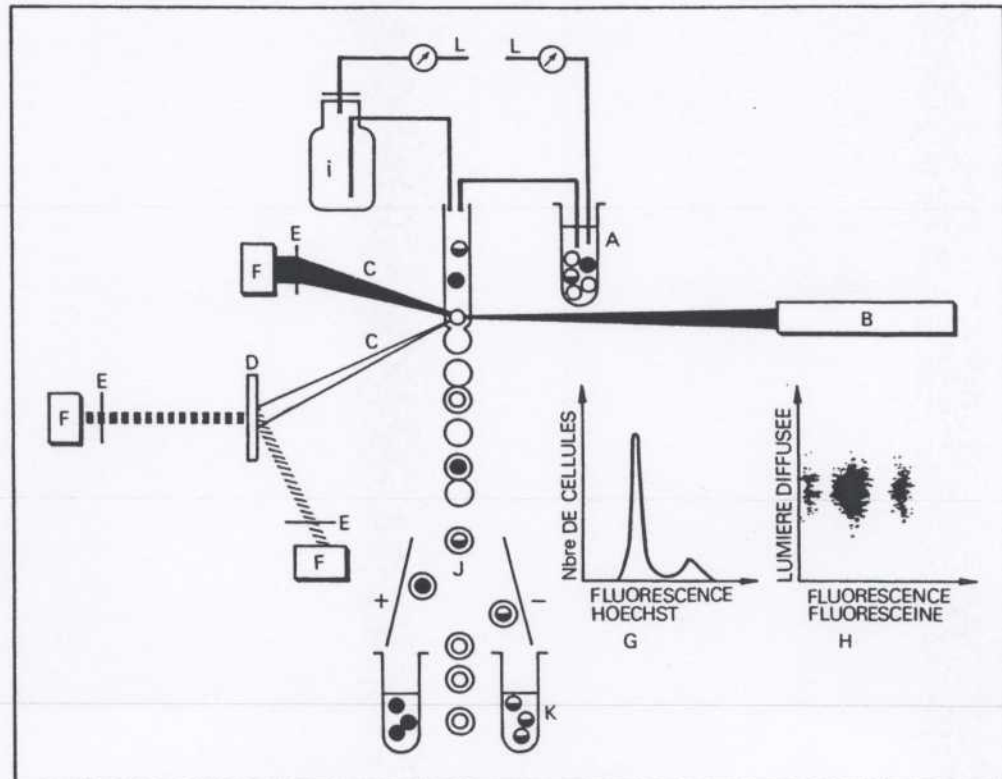


FIGURE 1 - Schéma explicatif du fonctionnement d'un cytomètre.

Les cellules mises en suspension (A) sont soumises à une surpression (L) qui les fait progresser et s'injecter au centre d'une veine liquide d'entraînement (I). Les cellules qui défilent une par une sont interceptées par un faisceau lumineux émis par un laser (B). Ces cellules émettent en réponse des signaux optiques (C) qui sont guidés par des miroirs dichroïques (D) et des filtres (E) vers des photomultiplicateurs.

Un tri cellulaire peut s'effectuer en fractionnant la veine liquide en gouttelettes qui seront chargées négativement (sous-population 1 à isoler) ou positivement (sous-population 2) puis déviées de leur trajectoire en passant dans un champ électrique (J) et recueillies dans des tubes différents (K).

Les résultats de l'analyse sont sous forme d'histogramme monoparamétrique (G) ou de cytogramme bi-paramétrique H.

D'après METEZEAU *et al.*, vol. 1, 1988, p. 18.



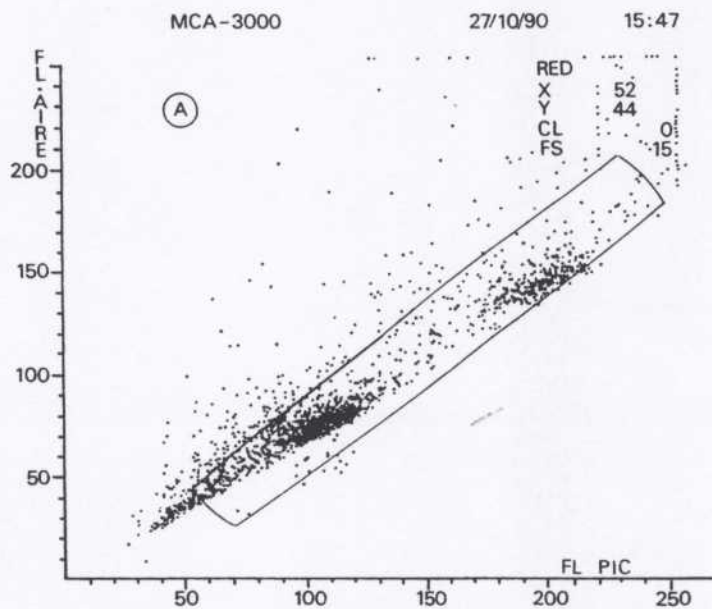
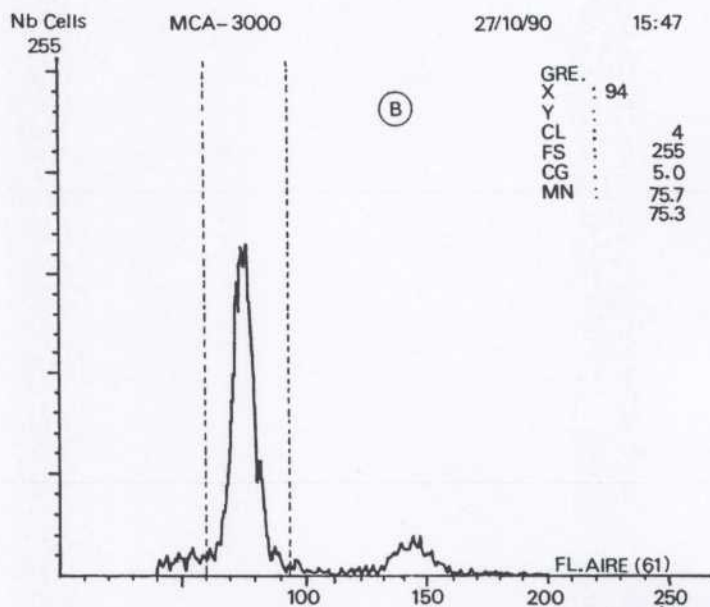


FIGURE 2 - Matérialisation des résultats obtenus après analyse cytométrique des noyaux d'une jeune feuille de mandarinier commun.

A - Définition de la fenêtre permettant de mettre hors analyse les débris nucléaires et les noyaux accolés.

B - Histogramme du nombre de noyaux en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée.



tant le nombre de noyaux en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée (figure 2).

Dans le cas présenté par la figure 2, les 2 pics correspondent à deux valeurs différentes d'intensité de fluorescence après coloration des noyaux par l'iodure de propidium, un des colorants spécifiques de l'ADN utilisé en CMF. On est en présence de 2 populations cellulaires contenant des quantités d'ADN différentes, l'une étant double de l'autre.

Les histogrammes sont fournis par l'appareil avec une liste de statistiques rapidement calculées grâce à l'informatique :

- nombre d'événements,
- nombre de noyaux ou de cellules prises en compte (ce nombre peut être défini par avance),

- pourcentage de noyaux pris en compte/nombre total d'événements,
- valeur moyenne des pics,
- déviation standard (écart-type),
- coefficient de variation (rapport de l'écart-type à la moyenne).

**Analyse de l'ADN nucléaire par la cytométrie de flux.**

• Contraintes techniques.

- Les noyaux étudiés doivent être en suspension, c'est là en fait une des plus grandes contraintes.

Pour analyser les noyaux des tissus de plantes cultivées *in vitro* ou en pleine terre, l'expérience montre qu'en hâchant rapidement de jeunes feuilles dans un tampon

| Classe             | Sonde               | Spectre                  |                        |
|--------------------|---------------------|--------------------------|------------------------|
|                    |                     | Absorption maximale (nm) | Emission maximale (nm) |
| Feulgen            | Acridine orange     | 444                      | 550                    |
|                    | Auramine O          | 450                      | 550                    |
| Intercalants       | Acridine orange     | 492                      | 530                    |
|                    | Bromure d'éthidium  | 370-530                  | 605                    |
|                    | Iodure de propidium | 370-550                  | 620                    |
| Spécifiques de A-T | DAPI                | 340                      | 465                    |
|                    | DAPI                | 340                      | 465                    |
|                    | Hoechst 33342/33258 | 340                      | 450                    |
| Spécifiques de G-C | Chromomycine A3     | 420                      | 560                    |
|                    | Mithramycine        | 420                      | 560                    |
|                    | Olivomycine         | 420                      | 560                    |

FIGURE 3 - Caractéristiques des principaux fluorochromes utilisés en cytométrie en flux dans l'analyse de l'ADN. (d'après METEZEAU *et al.*, vol. 1, 1988).

refroidi, les noyaux libérés sont assez nombreux pour qu'une analyse soit possible. En ce qui concerne les cals en suspension en milieu liquide, il faut dissocier les agrégats cellulaires avant de faire éclater les cellules comme les protoplastes pour libérer les noyaux. Dans tous les cas, un perméant (triton) facilite l'entrée dans les noyaux du colorant spécifique de l'ADN, qui a été choisi.

- Le choix du fluorochrome.

L'ADN est coloré par des fluorochromes spécifiques qui doivent être conformes aux exigences de cette technique : spectre d'excitation compatible avec les sources lumineuses, rendement quantique suffisant, stabilité du marquage et bon rapport stoechiométrique. La figure 3 présente les principales catégories de fluorochromes utilisés en cytométrie en flux.

- Les colorants de Feulgen-Schiff réagissent avec les fonctions aldéhydes des desoxyriboses démasqués par l'hydrolyse pour fournir des bases Schiff. Ces colorations longues à mettre en oeuvre sont considérées comme trop peu spécifiques.

- Les fluorochromes spécifiques des paires de base se fixent à l'extérieur de la double hélice sur AT ou sur GC. Ces colorants sont déconseillés pour déterminer la taille du génome puisque la coloration dépend de la richesse du génome en paires AT ou GC.

- Les fluorochromes intercalants sont les plus utilisés à cause de leur faible coût, leur bon rendement et leur bonne absorption des sources lumineuses.

Le bromure d'éthidium et l'iodure de propidium s'intercalent dans les acides nucléiques double brin. L'iodure de propidium, IP, est le fluorochrome qui a été utilisé pour l'obtention des résultats présentés dans ce travail.

- La nécessité de définir pour un matériel donné les conditions optimales d'analyse :

- nature du tampon,
- concentration du perméant,
- concentration du colorant nécessaire pour saturer le génome,

- durée de coloration avant l'analyse,
- standardisation des conditions expérimentales.

- Les mesures doivent être réalisées sur un nombre de noyaux conséquents permettant des analyses statistiques valables et si possible toujours le même afin de pouvoir établir des comparaisons. Dans tous les cas présentés ici, 2 000 noyaux ont été analysés.

- La nécessité enfin d'avoir des témoins significatifs.

En effet, les mesures d'intensité de fluorescence, correspondant à des quantités d'ADN, sont exprimées en unités arbitraires. Pour prendre une signification, ces valeurs doivent être comparées à des valeurs repère (niveau de ploïdie par exemple) définies à l'aide d'un témoin. Ce témoin sera analysé au début de chaque séance de mesures afin d'éliminer les variations dues aux réglages de l'appareil.

#### ● Informations obtenues.

Cette technique d'analyse appliquée à l'ADN permet :

- l'étude du cycle cellulaire (GALBRAITH, 1983),

- la détermination de la taille d'un génome (RAYBURN et AUGER, 1990) et donc l'appréciation du niveau de ploïdie des noyaux étudiés par rapport à un témoin dont la ploïdie est connue (De LAAT *et al.*, 1987 ; PIJNACKER *et al.*, 1989).

- Le cycle cellulaire.

Dans un méristème caulinaire ou racinaire ou bien dans des feuilles encore jeunes, les cellules se divisent régulièrement. Entre deux divisions successives, la cellule subit un certain nombre d'événements morphologiques et biochimiques tout au long de ce qui est appelé le cycle cellulaire.

Selon le concept d'HOWARD et PELC (1951), le cycle cellulaire est classiquement subdivisé en 4 phases (figure 4) :

- une phase de pré-synthèse G1,
- une phase de synthèse de l'ADN,



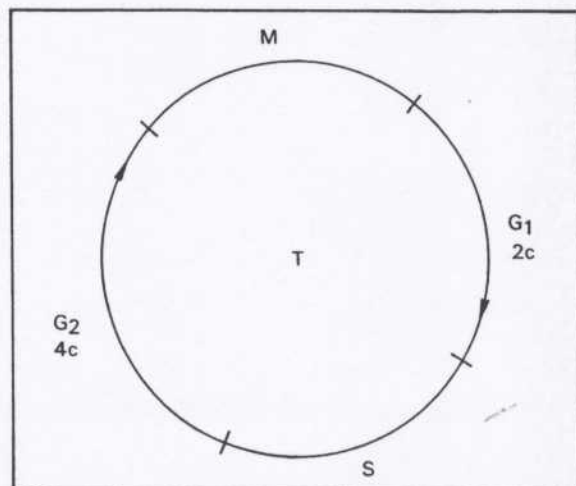


FIGURE 4 - Cycle cellulaire (T) parcouru par des cellules méristématiques qui se divisent régulièrement. (G1) phase de pré-synthèse ; (G2) phase de post-synthèse ; (M) mitose ; (S) synthèse d'ADN. (2c, 4c) quantité d'ADN des noyaux de cellules diploïdes respectivement en phase G1 et G2.

- une phase de post-synthèse G2,
- la phase M de division cellulaire.

Chaque phase se caractérise par un certain nombre de processus biochimiques. La grande majorité des constituants cellulaires double pendant le cycle et leur synthèse a lieu de façon continue avec des taux variables sauf pour les histones, certaines enzymes nucléaires impliquées dans le processus de replication de l'ADN et bien sûr l'ADN dont la duplication s'effectue pendant la phase S. Pour une cellule diploïde ayant 2n chromosomes, la quantité d'ADN est 2C pendant la phase G1 mais 4C pendant la phase G2.

Dans une population cellulaire active, les cellules sont asynchrones. A un moment, t, elles se trouvent diversement réparties dans tous les stades du cycle. Le pourcentage des cellules dans chaque phase dépend de la durée de chacune des phases. Si l'on peut déterminer par cytométrie de flux le pourcentage de noyaux en G1 ou en G2, on peut apprécier la durée de ces phases. Les mesures en CMF de cellules méristématiques donnent en effet des histogrammes à 2 pics correspondant aux noyaux étant au moment du prélèvement en G1 ou en G2 (figure 5). L'importance du pic G1 comparé au pic G2 traduit la durée plus longue de la phase G1.

Lorsque les cellules se différencient, elles sortent du cycle. Si elles sortent alors qu'elles sont en phase G1, leur teneur en ADN = 2C si elles sortent alors qu'elles sont en phase G2 et cela peut se produire chez les végétaux (D'AMATO, 1952), certaines cellules ont une teneur en ADN = 4C. Elles sont donc potentiellement polyploïdes.

Ces données montrent qu'il est possible de révéler par cytométrie, lorsque les cellules analysées sont encore méristématiques, une population de noyaux 4C alors que l'ensemble est diploïde.

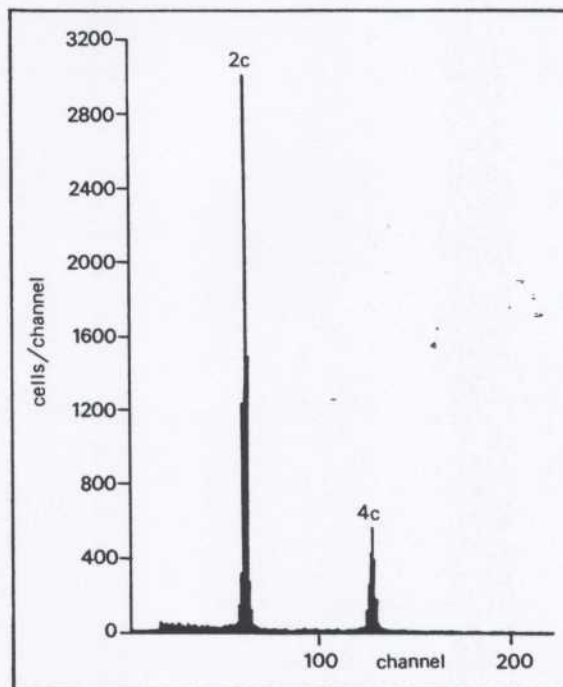


FIGURE 5 - Histogramme obtenu après analyse par cytométrie en flux de cellules méristématiques. Les deux pics correspondent aux noyaux qui sont en phase G1 ou G2 au moment de l'analyse.

Il est donc impératif, pour bien interpréter les résultats obtenus en cytométrie en flux, d'utiliser comme témoin le même type cellulaire que celui des échantillons à analyser : méristèmes ou cellules différenciées (partie centrale de la feuille de rang n-2 par exemple) et de compléter les résultats par quelques contrôles de comptages chromosomiques.

- La détermination de la taille du génome.

Si l'intensité de fluorescence mesurée est corrélée à une quantité donnée d'ADN, la taille du génome étudié peut être appréciée :

- taille relative en fonction d'un témoin qui se révèle être plus ou moins grand,
- taille absolue exprimée en pg ou en nombre de paires de bases si l'on connaît la quantité en ADN du génome témoin utilisé.

Lorsque la taille d'un génome témoin est corrélée à un niveau de ploïdie, on peut de ce fait définir la ploïdie du génome étudié.

Les mesures réalisées à ce jour ne portent que sur des noyaux provenant de feuilles. Afin d'appliquer plus largement cette technique, il s'avère important de définir des protocoles expérimentaux permettant une analyse fiable :

- de noyaux de feuilles fixées ou conservées par lyophilisation,
- de noyaux de cals frais ou fixés,
- de noyaux de protoplastes et suspensions cellulaires.



### QUELQUES EXEMPLES D'APPLICATION DE LA CYTOMETRIE EN FLUX A LA GENETIQUE DES AGRUMES

L'estimation rapide de la taille du génome nucléaire permet d'envisager trois grands domaines d'application de la cytométrie de flux à la génétique des agrumes : 1) l'évaluation génétique, 2) la recherche de polyploïdes pour les programmes d'amélioration, 3) le contrôle de la stabilité de la taille du génome lors de l'embryogenèse somatique *in vitro*. Les deux premiers aspects ont d'ores et déjà fait l'objet d'études préliminaires.

#### Evaluation génétique.

##### ● Problématique.

Chez tous les *Citrus* et genres apparentés, le nombre de chromosomes de base est  $n = 9$  (KRUG, 1943). Malgré des taux de triploïdisation et de tétraploïdisation spontanées non négligeables dans les semis de graines polyembryonnées (1 à 3 p. 100 ; BARRETT et HUTCHISON, 1978), la grande majorité des agrumes est diploïde. Les niveaux de ploïdie supérieurs à  $2n$  semblent ainsi avoir été généralement contre-sélectionnés, soit par l'homme car ils présentaient peu d'intérêt agronomique, soit naturellement, en raison de moindre vigueur et fertilité (IWAMASA *et al.*, 1988). Toutefois, lors de l'établissement de conservatoires génétiques, cette aptitude à la polyploïdisation spontanée, peut être génératrice de variations indésirables. Ce, plus particulièrement pour les porte-greffe introduits par semis de pépins polyembryonnés. Le niveau de ploïdie doit donc être contrôlé au même titre que l'origine nucellaire ou zygotique des plants obtenus (cette dernière est testée par l'étude du polymorphisme enzymatique).

L'analyse des chromosomes au stade pachytène (NAIR et RANDHAWA, 1969) a, par ailleurs, mis en évidence des différences de morphologie entre espèces et entre cultivars. En revanche, à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée pour voir si ces modifications de structure chromosomique étaient associées à des variations de taille du génome. Ceci constitue pourtant une information importante pour les programmes de cartographie du génome (ROOSE, 1988 ; LURO *et al.*, 1991).

La cytométrie en flux va nous permettre de contrôler la conformité du niveau de ploïdie du matériel introduit en collection et également d'évaluer la taille relative du génome des différentes espèces du genre *Citrus* et des genres apparentés.

##### ● Etude préliminaire.

Une soixantaine d'agrumes de la collection de l'INRA-IRFA San Giuliano ont été analysés. La mandarine commune, retenue comme témoin diploïde a été régulièrement étudiée (tous les dix à quinze échantillons) afin de contrôler d'éventuelles fluctuations des mesures. Dans cette étude préliminaire, les conditions expérimentales n'étaient pas optimales et des fluctuations de l'ordre de 6 à 7 p. 100 ont été observées pour les valeurs moyennes d'un même échantillon. Plusieurs résultats sont cependant clairement établis :

- la quasi-totalité des *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus* et *Eremocitrus* analysés sont diploïdes et les tailles de leur génome sont très voisines. Il semble toutefois que le génome des cédratiers et dans une moindre mesure celui des limettiers soit plus grand que celui des autres *Citrus*. De même, le génome de *Citropsis gillettiana* est sensiblement plus grand que ceux de *Citropsis gabunensis* et de *Citropsis articulata* (figure 6), dont les tailles de génome sont voisines de celles de la majorité des autres agrumes. Les variations de taille observées entre les espèces du genre *Citrus* sont cohérentes avec les études de marquage moléculaire (RFLP GREEN *et al.*, 1986 ; isozyme, OLLITRAULT, 1990) qui concluaient à l'originalité des cédratiers au sein du genre *Citrus* et à une participation des cédratiers à la genèse des limettiers. Ces résultats doivent toutefois être confirmés dans de meilleures conditions expérimentales.

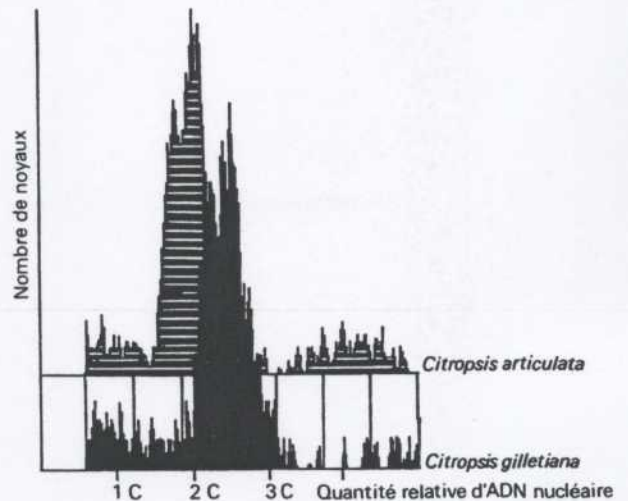


FIGURE 6 - Variation de la taille du génome dans le genre *Citropsis*.

- trois *Poncirus* tétraploïdes ont été identifiés (figure 7). Il s'agit des *Poncirus* «Z4», «Z24», et «Japon feuille longue».

- la triploïdie du limettier Tahiti est confirmée (figure 8).

#### Recherche de polyploïdes dans le cadre des programmes d'obtention de cultivars triploïdes aspermes.

##### ● Problématique.

L'obtention de variétés aspermes constitue l'un des objectifs majeurs des programmes de sélection des cultivars. La création de cultivars triploïdes, qui est l'une des voies pour y parvenir, peut se faire suivant trois approches :

- l'hybridation entre cultivars diploïdes et tétraploïdes. Cette stratégie réclame deux cycles de sélection. Dans un premier temps il faut sélectionner des géniteurs tétraploïdes soit dans des semis (ESEN et SOOST, 1977), soit après traitement à la colchicine (GMITTER et LING, 1991). Dans un second temps il faut vérifier le niveau triploïde des plants obtenus par hybridation, et ce, plus particulièrement si le parent femelle est polyembryonné,



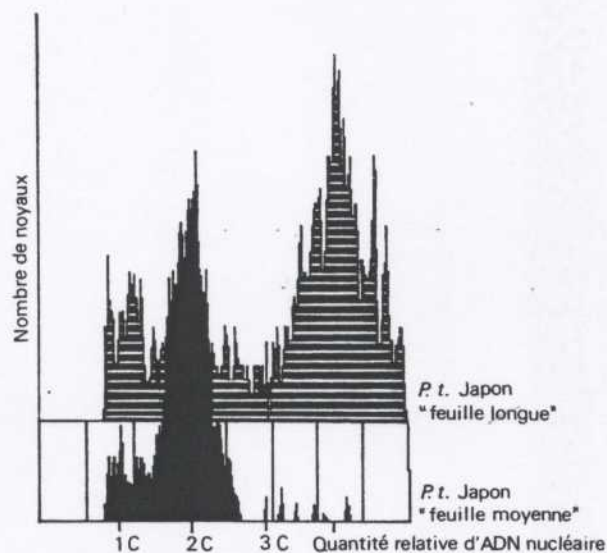


FIGURE 7 - Identification d'un *Poncirus* tétraploïde.

- la culture *in vitro* d'albumen (GMITTER *et al.*, 1990),

- la recherche d'embryons triploïdes spontanés dans les pépins. Ces embryons sont issus de la fécondation d'un gamète femelle non réduit par un gamète mâle haploïde (ESEN et SOOST, 1971) et leur fréquence est de l'ordre de quelques p. 100 (IWAMASA et NITO, 1988).

Toutes ces approches nécessitent un contrôle du niveau de ploïdie. Celui-ci peut être réalisé par comptage chromosomique lorsque le niveau de ploïdie recherché est fréquent dans la population analysée (ex : culture d'albumen). En revanche cette technique devient vite très lourde lorsque cette fréquence n'est que de quelques p. 100. La cytométrie en flux trouve alors tout son intérêt, puisqu'elle permet de cribler une centaine d'individus par jour. La recherche de tétraploïdes et triploïdes spontanés dans des semis devient ainsi tout à fait envisageable.

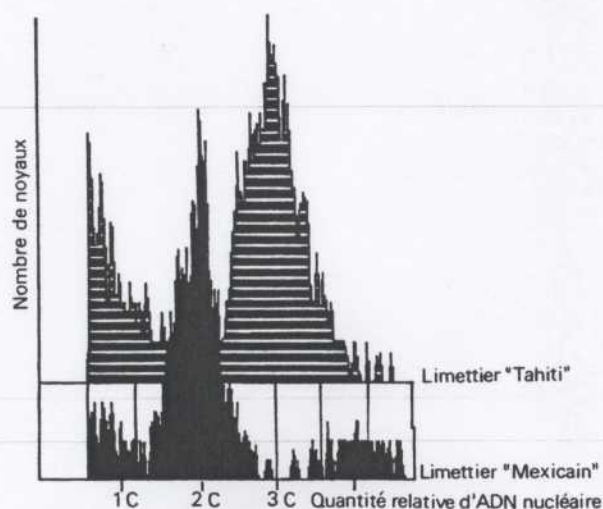


FIGURE 8 - Triploïdie du limettier 'Tahiti'.

● Exemples d'application.

- Evaluation du niveau de ploïdie de plants de mandariniers communs traités à la colchicine.

Un programme de création de mandarinier asperme, par hybridation tétraploïde x diploïde est engagé sur la station de San Giuliano. La première phase, actuellement en cours, consiste en la recherche de mandariniers tétraploïdes. Des essais préliminaires de traitement d'apex à la colchicine réalisés avant microgreffage ont permis de régénérer deux plants. Ceux-ci étant greffés nous ne disposions pas de pointes de racine pour effectuer des comptages chromosomiques ; nous avons donc eu recours à la cytométrie en flux. Les résultats (figure 9) démontrent claire-

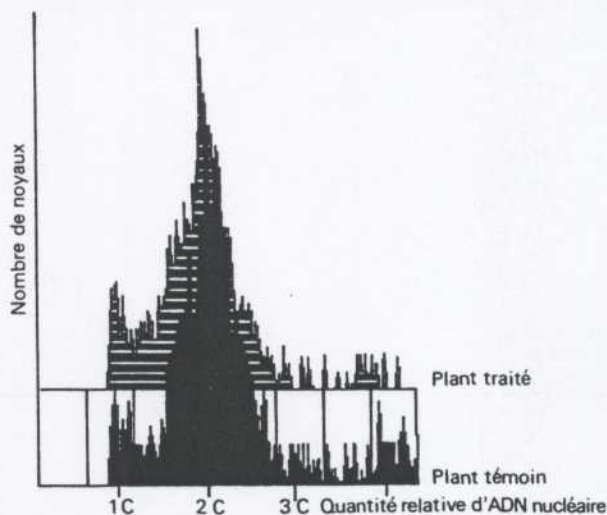


FIGURE 9 - Contrôle du niveau de ploïdie d'un mandarinier commun traité à la colchicine.

ment l'échec du doublement chromosomique.

- Recherche de polyploïdes spontanés dans des semis de *Citrus volkameriana*.

De nombreux plants aberrants de *C. volkameriana* ont été obtenus par semis. Il était intéressant de vérifier si leur faible vigueur était due à la dépression de consanguinité ou à une polyploïdisation spontanée. L'analyse d'une quinzaine d'entre eux a permis d'identifier deux plants tétraploïdes (figure 10), tandis que les autres plants sont apparus diploïdes. L'étude de quatre systèmes enzymatiques a montré que les plants tétraploïdes étaient issus d'un doublement chromosomique de tissus somatiques, tandis que les autres plants, chétifs, étaient d'origine zygote.

Contrôle de la stabilité de la taille du génome dans les programmes de propagation de masse par embryogénèse somatique.

Les cals nucellaires d'agrumes permettent de produire des quantités très importantes d'embryons somatiques. Toutefois, les modifications de niveaux de ploïdie des cellules, au sein des cals, sont des phénomènes fréquents et sont l'une des causes des variations somaclonales. De plus, les tissus nucellaires des agrumes présentent *in vivo*

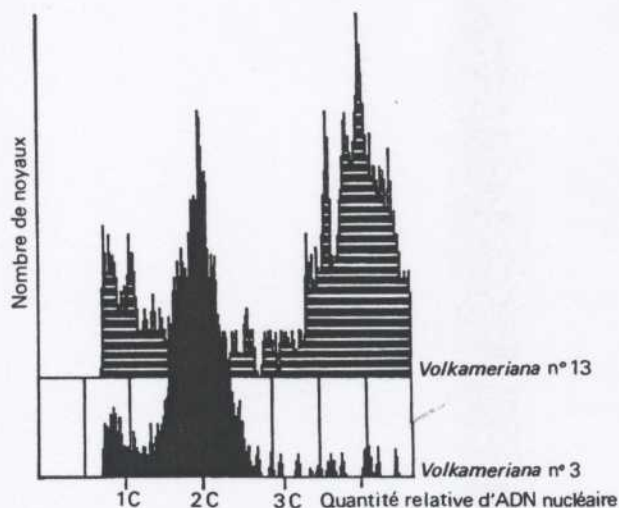


FIGURE 10 - Recherche de polyploïdes dans un semis de *Citrus Volkameriana*.

une aptitude non négligeable à produire des embryons tétraploïdes. Il apparaît donc nécessaire de contrôler le niveau de ploïdie des vitroplants régénérés à partir des cals nucellaires. La cytométrie en flux pourrait ainsi constituer un des outils de contrôle privilégié, pour définir les processus de propagation de masse des porte-greffe, par embryogenèse somatique *in vitro*.

## CONCLUSION

Couramment utilisée dans le domaine médical, la cytométrie en flux ouvre des perspectives prometteuses pour la génétique végétale ; principalement pour l'évaluation de la taille du génome nucléaire et le tri cellulaire en condition vitale (ex. : fusion de protoplastes).

Les applications que nous avons envisagées et abordées pour les agrumes, ne prennent en compte que le premier aspect. Le coefficient de variation des mesures obtenues lors des expériences préliminaires est trop important pour détecter à coup sûr des aneuploïdes, ou pour déterminer précisément des faibles variations de taille du génome. La définition d'un protocole optimum devrait toutefois réduire sensiblement la variance expérimentale, et autoriser ainsi des analyses plus fines.

Les coefficients de variations actuels sont, d'ores et déjà, tout à fait satisfaisants pour discriminer les différents niveaux de ploïdie. La cytométrie en flux constitue ainsi un excellent marqueur des doublements chromosomiques spontanés ou provoqués, de la non-réduction des gamètes, et de l'haplogénèse. A ce titre cette technique est complémentaire des analyses du polymorphisme enzymatique et du RFLP, qui sont pour leur part de bons marqueurs de la recombinaison sexuée. La facilité et la rapidité de mise en oeuvre, et par là même les effectifs importants analysables en routine, seront des atouts déterminants pour la sélection de cultivars triploïdes et pour le contrôle de la stabilité du niveau de ploïdie dans les programmes d'embryogenèse *in vitro*.

## BIBLIOGRAPHIE

- BARRETT (H.C.) and HUTCHISON (D.J.). 1978.  
Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*.  
*Econ. Bot.*, (32), 27-45.
- BROWN (S.C.), BERGOUNIOUX (C.), TALLET (S.) and MAPLE (D.). 1991.  
In : *Practical guide to plant cellular and molecular techniques*.  
Eds I. Potrykus and J. Neguitiu. Birkhäuser, Zurich.
- D'AMATO (F.). 1952.  
New evidence on endopolyploidy in differentiated plant tissues.  
*Caryologia*, 4, 121-144.
- D'AMATO (F.). 1985.  
Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates.  
*CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 3, 73-112.
- De LAAT (A.M.M.), GOUDE (W.) and VOGELZANG (J.D.C.). 1987.  
Determination of ploidy of single plants and plant population by flow cytometry.  
*Plant Breeding*, 99, 303-307.
- ESEN (A.) and SOOST (R.K.). 1971.  
Unexpected triploid in *Citrus* : Their origine, identification and possible use.  
*J. Hered.*, (62), 329-333.
- ESEN (A.) and SOOST (R.K.). 1977.  
Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo : endosperm ploidy ratio in *Citrus*.  
In «*I. Congreso mundial de Citricultura, 1973*» (O. Carpena, ed.)  
Murcia, Valencia, (II), 53-63.
- GALBRAITH (D.W.). 1983.  
Flow cytometric analysis of the cell cycle.  
In «*Cell culture and somatic cell genetics of plants*», vol. 1,  
765-767, Acad. Press.
- GMITTER (F.G.), LING (X.B.) and DENG (X.X.). 1990.  
Induction of triploid *Citrus* plants from endosperm calli *in vitro*.  
*Theor. Appl. Genet.*, (80), 785-790.
- GMITTER (F.G.) and LING (X.). 1991.  
Embryogenesis *in vitro* and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped *Citrus* ovules treated with colchicine.  
*J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116 (2), 317-321.
- GREEN (R.M.), VARDI (A.) and GALUN (E.). 1986.  
The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species, and comparison with related genera.  
*Theor. Appl. Genet.*, (72), 761-769.
- HOWARD (A.) and PELC (S.R.). 1951.  
Nuclear incorporation of P32 as demonstrated by autoradiographs.  
*Exp. Cell Res.*, 2, 178-187.
- IWAMASA (M.) and NITO (N.). 1988.  
Cytogenetic and the evolution of modern cultivated *Citrus*.  
in : *Proc. 6st int. Citr. Cong., Goren and Mendel eds., Philadelphie*, 265-275.
- KRUG (C.A.). 1943.  
Chromosome numbers in the subfamily *Aurantioideae* with special reference to the genus *Citrus*.  
*Bot. Gaz.*, 48, 602-611.
- LURO (F.), LAIGRET (F.) et OLLITRAULT (P.). 1991.  
Cartographie du génome des agrumes.  
*IRFA, Journées Agrumes et Mangués, Montpellier*, Doc. 70.
- METZEZAU (Ph.), RONOT (X.), LENOAN-MERDRIGNAC (G.) et RATINAUD (M.H.). 1988.  
La cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique.  
Vol. 1, *Medsi Mc Graw-Hill*.
- NAIR (P.K.R.) and RANDHAWA (G.S.). 1969.  
Chromosome morphology, of the pachytene stages with respect to different *Citrus* types.  
*Proc. first Int. Citrus Symp.*, (1), 215-223.



OLLITRAULT (P.). 1990.

Isozymes and RFLP's as genetic markers in citrus selection. in *Proc. 4th Int. Asia-Pacific conf. on Citrus rehabilitation. FAO-UNDP RAS/86/022 reg. proj.*, 57-68.

PIJNACKER (L.P.), SREE RAMULU (K.), DIJKHUIS (P.) and PERWERDA (M.A.). 1989.

Flow cytometric and karyological analysis of polysomaty and polyploidization during callus formation from leaf segments of various potato genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, 77, 102-110.

RAYBURN (A.L.) and AUGER (J.A.). 1990.

Genome size variation in *Zea mays* spp. may adapted to different altitudes. *Theor. Appl. Genet.*, 79, 470-474.

ROOSE (M.L.). 1988.

Isozymes and DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms in *Citrus* Breeding and Systematics. *Proc. 6st int. Citr. Cong.*, 155-165.

---

**ESTUDIO CRITICO DE LA TECNICA DE CITOMETRIA EN FLUJO APLICADA AL MEJORAMIENTO DE LAS PLANTAS : RESULTADOS OBTENIDOS PARA ALGUNOS CITRICOS.**

**P. OLLITRAULT y Nicole MICHAUX-FERRIERE.**

*Fruits*, Numéro spécial Agrumes 1992, p. 195-203.

**RESUMEN** - La citometría en flujo es un método de análisis de células o de núcleos aislados, acarreados por un flujo líquido. Esta técnica muy utilizada en el dominio medical permite, en condiciones experimentales dadas, medidas de volumen (celular o nuclear), y de fluorescencia. Cuando el marcado fluorescente realizado es específico de una sustancia (ADN por ejemplo), un análisis cuantitativo se puede proyectar. La rapidez de análisis ( $10^4$  a  $10^6$  acontecimientos/mn), la posibilidad de selección celular en condiciones vitales, la determinación en una población dada de la distribución de un parámetro estudiado (cantidad de ADN, cantidad de ARN) por fin el poder de realizar un análisis multiparamétrico son los mayores triunfos de esta técnica. Con la experiencia reciente y todavía limitada del laboratorio, dos tipos de resultados se pueden obtener de manera fiable.

1. El nivel de ploïdia de una muestra dada se puede revelar rápidamente.
  2. La talla relativa del genomio de una serie de genotipos, de especies, de géneros o de familias se puede apreciar y comparar.
- La introducción en el análisis del genomio de talla conocida permite determinar el contenido real en ADN (pg) del genomio estudiado. El análisis de unos sesenta cítricos de la colección de Córcega permitió confirmar la diploïdia de la casi-totalidad de los *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus* y *Eremocitrus* considerados. Sin embargo, tres *Poncirus* tetraploïdos fueron identificados y la triploïdia del limero Tahití fué comprobada. Parece, por otra parte, que exista una variación de la talla del genomio entre algunas especies del género *Citrus* asi como entre las especies del género *Citropsis*.