

SECTION D

**Marquage moléculaire,
biodiversité et sélection**

Communications orales D1 à D11

D1 : Qu'avons nous appris en analysant le génome d'*Arabidopsis thaliana* ?

DELSENY M.

Université de Perpignan, Laboratoire de Physiologie et Biologie Moléculaire des plantes - UMR 5545 du CNRS, 66 860 - PERPIGNAN Cedex. Tél. : 33 4 68 66 88 48
- Fax : 33 4 68 66 84 99. e-mail : delseny@univ-perp.fr.

INTRODUCTION

Le choix d'*Arabidopsis thaliana*, comme espèce végétale modèle pour analyser le génome des plantes est justifié par la petite taille de son génome, 120 Mbp environ répartis en cinq paires de chromosomes, l'un des plus petits décrits chez les plantes. La plante est essentiellement autogame et se prête bien à l'analyse génétique, aussi bien classique que reverse. De plus, elle se développe rapidement sans exiger beaucoup de place ni de soin, ce qui en fait un objet d'étude particulièrement intéressant dans un contexte académique (1). Depuis 1989, la recherche sur *Arabidopsis thaliana* est coordonnée au niveau mondial et depuis 1992, plusieurs projets, principalement européens ont permis d'envisager le séquençage complet du génome de cette plante. Cet exposé sera limité à ce que nous avons appris du séquençage systématique.

En fait, ces projets de séquençage, comprennent deux grands volets : le séquençage rapide et partiel des gènes exprimés, sous la forme d'étiquettes ADNc ou EST (*Expressed Sequence Tags*, terme anglais signifiant étiquetage d'une séquence transcrite), et le séquençage génomique complet. Fin 1991, moins de 200 séquences (ADNc, gènes ou protéines) étaient connues chez *Arabidopsis*. La première tâche entreprise fut de séquencer systématiquement des ADNc de façon à dresser un catalogue des gènes exprimés. Cette tâche a été partagée entre un consortium français et un consortium américain. La seconde tâche entreprise fin 1993 par le programme Européen ESSA (European Scientists Sequencing Arabidopsis) a consisté à analyser la séquence de grands morceaux d'ADN chromosomique.

Le séquençage d'EST (*Expressed Sequence Tags*)

Une EST est une séquence de 300-400 pb, déterminée une seule fois, portant sur l'extrémité 5' ou 3' d'un clone ADNc. En séquençant en aveugle un grand nombre d'EST on obtient une représentation de la population d'ARNm dans un tissu ou un stade de développement donné.

Les stratégies américaines et françaises ont été légèrement différentes. Les américains ont réalisé une banque d'ADNc unique à partir de mélanges d'ARNm préparés à partir des différents tissus de la plante, alors que les français ont réalisé des banques spécialisées correspondant à leur centre d'intérêt biologique. Les américains n'ont séquençé que l'extrémité 5' des clones, alors que de très nombreux ADNc ont été séquençés aux deux extrémités par les français. Alors que le programme européen n'a financé que les séquences nouvelles, aucune contrainte de redondance n'a été imposée aux collègues américains.

L'effort conjoint des deux consortiums a ainsi permis d'obtenir près de 30 000 étiquettes en moins de cinq ans. Du fait de la redondance on peut estimer qu'au moins la moitié des quelques 20 000 gènes du génome d'*Arabidopsis* ont ainsi été étiquetés (2).

Le séquençage en lui-même constitue une opération facile. La difficulté est de déchiffrer le message ainsi obtenu. La première analyse réalisée consiste à traduire la séquence de l'ADNc dans chacune des six phases de lecture possibles et à comparer la traduction aux séquences protéiques engrangées dans les bases de données. Les logiciels FASTA, BLAST et quelques autres permettent ce travail. Ainsi, si l'on ne considère que les séquences non redondantes, on peut observer que près de 40 % d'entre elles présentent une homologie significative avec une protéine déjà connue chez un autre organisme. Cela signifie que près de 60 % des clones séquencés et non redondants sont sans fonction connue. Ainsi par simple séquençage partiel on a pu obtenir une information de séquence et proposer une fonction potentielle pour près du quart des gènes d'*Arabidopsis*. Ces résultats sont des résultats moyens sur l'ensemble du programme et peuvent varier d'un tissu à l'autre.

Que peut-on faire avec les EST ?

Le premier renseignement tiré des EST est bien sûr la connaissance et l'identification potentielle d'un gène. Les premières applications mises en place par nos laboratoires ont concerné surtout la biologie. Chaque EST peut constituer une sonde pour analyser l'expression d'un gène. Lorsque les EST révèlent l'existence de familles multigéniques, il devient possible d'analyser leur expression différentielle et d'en rechercher les mécanismes de contrôle. Le nombre de gènes appartenant à des petites familles multigéniques a constitué l'une des surprises majeures du programme.

Une deuxième application des EST a été de les utiliser pour faire de la cartographie du génome d'*Arabidopsis*. La première stratégie utilisée a été la technique classique par RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), mais on peut aussi utiliser les informations de séquences pour définir des marqueurs PCR. Cette stratégie a été particulièrement utile pour typer des clones YAC (*Yeast Artificial Chromosome*), définir quelles EST étaient communes à plusieurs YAC, et aussi définir des contigs et réaliser la carte physique des chromosomes. Celle-ci est maintenant quasiment achevée pour trois des cinq chromosomes et en voie de l'être pour les deux autres (3).

On doit se poser la question de savoir combien de gènes avons-nous réellement identifié. Cette question est abordée en regroupant toutes les EST qui présentent des régions chevauchantes identiques ou très proches de façon automatique. Ainsi les 30 000 EST peuvent être regroupées en 13 000 contigs (4), ce qui est sans doute une surestimation du nombre réel de gènes, puisque deux contigs peuvent correspondre à un même gène s'il n'y a pas, par exemple, d'EST dans la région centrale du gène chevauchant avec celles de la partie 5' ou de la partie 3'.

Nous avons essayé de préciser la situation dans le cas des EST correspondant à des protéines ribosomiques cytoplasmiques : nous avons ainsi reconstitué 106 ADNc distincts correspondant à 50 types de protéines différentes (5).

Une dernière application des EST est le repérage des gènes et en particulier des bordures entre exons et introns.

Le séquençage génomique

Le séquençage génomique, dans le cadre du programme ESSA 1 a porté sur environ 2,5 Mpb dont 1,8 Mpb d'un seul tenant autour du locus *FCA*, un gène contrôlant la précocité de la floraison situé sur le chromosome 4.

Au total près de 450 gènes ont été entièrement séquencés (6, 7).

Le programme a rencontré plusieurs types de difficultés. La première a été l'obtention de clones prêts à séquencer. Il a fallu d'abord organiser les contigs de phages ou de

cosmides, dont le sous-clonage orienté est laborieux avec un chevauchement minimal. Il a fallu apprendre à travailler d'une autre façon, quasi-industrielle et surtout, il a fallu être capable de repérer les gènes et leurs limites dans les séquences obtenues car de très nombreux gènes sont beaucoup plus morcelés que l'on ne s'y attendait.

L'obtention préalable de 30 000 EST d'*Arabidopsis*, et l'utilisation d'EST humaines ou du nématode *Caenorhabditis elegans* ont grandement facilité la tâche et l'isolement d'ADNc complets correspondant aux gènes séquencés a permis d'améliorer les programmes de prédiction de gène. Selon les régions séquencées de 40 à 60 % des gènes prédits présentent une identité de séquence avec une EST ce qui confirme bien que le programme EST a probablement repéré environ la moitié des gènes.

Les principaux enseignements sont que la densité de gène est très élevée (1 gène tous les 4-5 kpb) ce qui ne laisse pas la place pour plus de 20 000 gènes. Ces gènes ne sont pas groupés de façon fonctionnelle évidente, même si l'on observe des groupes de fonctions analogues. Les gènes sont morcelés avec souvent des exons de très petite taille. L'analyse détaillée de quelques gènes révèle l'existence de mécanismes d'épissage alternatif et de bordures d'introns atypiques, ce qui laisse entrevoir de nouvelles possibilités de régulation. Enfin, le séquençage génomique a révélé de nouveaux éléments transposables ainsi que des courtes duplications qui devraient être riches d'enseignement sur un mode d'évolution du génome.

CONCLUSION

Les cinq années écoulées ont vu se mettre en place une formidable machine technologique qui a fait faire un bond fulgurant à notre connaissance du génome d'*Arabidopsis*. Trois grandes orientations se dégagent maintenant :

- Achever le plus vite possible le séquençage complet du génome. Ce travail devrait être terminé en 2003, c'est-à-dire dans six ans (8).
- Développer les méthodologies d'identification de fonction des gènes d'*Arabidopsis*. Il n'y a malheureusement pas de méthode miracle. Les stratégies vont de la comparaison régulière des séquences encore inconnues avec les bases de données en croissance exponentielle à la création de collections de mutants d'insertion, en passant par un retour à la biochimie classique. Cette tâche nécessitera le travail de plusieurs générations de biologistes.
- Transférer au plus vite les acquis obtenus sur un génome modèle aux plantes d'intérêt économique. Cela va de l'utilisation directe de sondes d'*Arabidopsis* lorsqu'elles sont suffisamment conservées, à la mise en œuvre de stratégie PCR ou de cartographie comparée. Du point de vue des biotechnologies les principaux apports du programme de séquençage d'*Arabidopsis* ont été de permettre un accroissement considérable de la connaissance des gènes de plantes et la mise à disposition, dans le domaine public, d'informations permettant de repérer près de la moitié d'entre eux. Les séquences publiées sont ainsi maintenant utilisables pour aller rechercher les gènes homologues chez les espèces cultivées et s'en servir pour faire du génie génétique ou pour évaluer, au travers de l'étude de la variabilité génétique, les relations séquence-fonction pour certains gènes importants. De façon générale, ces programmes d'analyse du génome d'une espèce modèle a permis de faire faire un bon en avant considérable dans l'analyse de grandes fonctions telles que la floraison, les régulations hormonales ou la perception et la transduction des signaux de l'environnement. Ces connaissances nouvelles constituent le tremplin sur lequel les biotechnologies végétales devraient prendre un nouvel essor.

Enfin, le principal enseignement de ces programmes est l'émergence d'une nouvelle façon de travailler et de faire de la biologie en utilisant les informations contenues dans des bases de données largement publiques. On peut prévoir que l'existence de toutes ces séquences va révolutionner nombre de domaines de la biologie en changeant les stratégies expérimentales et en mettant sur le marché des nouveaux outils de diagnostic et de sélection.

Bibliographie

1. SOMERVILLE, C.R., MEYEROWITZ E.M. (1994). In *Arabidopsis* (Somerville C.R. Meyerowitz E.M. Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA.
2. DELSENY M., COOKE R., RAYNAL M., GRELLET F. (1997). FEBS Lett. 403, 221-224.
3. Schmidt R., West J., Love K., Leecham Z., Lister C., Thomson H., Bouchez D., Dean C. (1995). Science 270, 480-483.
4. RUNSLEY S., GLODEK A., SUTTON G., ADAMS M.D., SOMERVILLE C.R., VENTER J.C., KEERLAVAGE A.-R. (1996). Plant Physiol. 112, 1177-1183.
5. COOKE R., RAYNAL M., LAUDIÉ M., DELSENY M. (1997). Plant J. 11, 1127-1140.
6. Bevan M. (1977) Pip Newsletter 12, 5-8.
7. CHALWATZIS N. (1977) Pip Newsletter 12, 12-24.
8. BEVAN M., ECKER J., THEOLOGIS S. et al. (1997). Plant Cell 9, 476-478.

D2 : Utilisation des marqueurs moléculaires RFLP pour la caractérisation de la diversité génétique

LALAOUI-KAMAL M., ASSALI N.E.

Adresse : Dépt. Écologie Végétale, I.A.V. Hassan II, BP. 6202, Rabat-Instituts,
Maroc.

INTRODUCTION

Le genre *Medicago* renferme 34 espèces annuelles et 21 espèces pérennes. Ces espèces peuvent être diploïdes ou tétraploïdes, allogames ou autogames. Les *Medicago* annuelles ou « medics » présentent un intérêt agro-économique du fait de leur excellente qualité fourragère et de l'enrichissement de la fertilité du sol qu'elles assurent grâce à leur capacité de fixation de l'azote atmosphérique. Ils peuvent être donc exploités dans le système « Ley-farming » (rotation céréale/légumineuse).

La première évaluation génétique des medics à l'échelle nationale, a réalisée en utilisant les marqueurs isoenzymatiques comme moyen d'identification et de caractérisation génétique (El Mousadik, 1991). L'étude de 15 espèces à l'aide de 4 systèmes enzymatiques a révélé l'existence de 5 loci monomériques polymorphes qui ont permis de lever la difficulté d'identification de certaines espèces et d'évaluer les niveaux de variabilité génétique interspécifiques et des intraspécifiques. Cependant, le nombre de systèmes enzymatiques et d'allèles étudiés, souvent limité, ne permet pas d'obtenir un polymorphisme suffisamment important pour caractériser l'ensemble des variétés.

Les marqueurs moléculaires, basés sur le polymorphisme de la longueur de fragments de restriction d'ADN (RFLP), semblent être le meilleur outil pour remédier aux limites des marqueurs phénotypiques et enzymatiques. Leur puissance réside dans le fait qu'ils ne sont pas soumis aux conditions environnementales, aux relations Épistasies ou pleiotropiques. Ils peuvent être exploités non seulement dans l'identification variétale et la conservation des ressources phylogénétiques mais aussi dans la cartographie des loci affectant des caractères quantitatifs ainsi que leur suivi dans des programmes d'introgression-sélection (Primard, 1985).

Dans cette étude nous avons utilisé des sondes appartenant à des unités ribosomiques nucléaires (unité ribosomique entière 8.2 Kb du lin et le gène 18S du tournesol) pour analyser la variabilité génétique au sein de 6 espèces annuelles du genre *Medicago*. Les unités ribosomiques ont été largement utilisées pour évaluer le polymorphisme interspécifique et intraspécifique. Le haut degré de répétition de ces unités ribosomiques a facilité l'établissement des relations phylogénétiques pour un grand nombre d'espèce (Kabbaj et al., 1995 ; Faivre-Rampant et al., 1992 ; Zeboudg et al., 1994 et Jeandroz et al., 1995).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Le matériel végétal comprend six espèces annuelles du genre *Medicago* représentées par dix écotypes locaux et deux cultivars étrangers (**tableau 1**). La majorité du matériel végétal étudié provient des collections conservées à l'Institut National de la Recherche Agronomique (station Guich-Rabat) et au Centre de Production des Semences Pastorales (Direction de l'Élevage CPSP El Jadida). Quatre individus de chaque Écotype ont été analysés.

Tableau 1 : Liste, désignation et origine géographique des espèces étudiées

Espèce	Écotype ou cultivar	Origine	Désignation
<i>M. aculeata</i>	GR 229	Maroc	I.1
	GR 109	Maroc	I.2
<i>M. ciliaris</i>	GR 372	Maroc	1.1
	GR 841	Maroc	1.2
<i>M. intertexta</i>	GR 371	Maroc	2.1
	GR 372	Maroc	2.2
<i>M. murex</i>	zodiac	Australie	3.1
	GR 170	Maroc	3.2
<i>M. polymorpha</i>	GR 154	Maroc	4.1
	MA 144	Maroc	4.2
<i>M. truncatula</i>	GR 76	Maroc	Tr.1
	jemalong	Australie	Tr.1

Préparation de l'ADN total

La technique d'extraction d'ADN utilisée dérive de celle mise au point par Dellaporta et al. (1983). La quantité et la qualité d'ADN génomique obtenu est estimée par spectrophotométrie et coloration au bromure d'Ethidium après électrophorèse.

Restriction enzymatique, électrophorèse et transfert d'ADN sur membrane

L'ADN génomique total (10 g) est digéré séparément par les enzymes Eco RI et Rsa I pendant au moins 1 heure à la température optimale d'activité recommandée pour chaque enzyme. Les fragments de restriction sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %). L'ADN séparé sur gel est dépuriné, dénaturé puis transféré sur membrane de Nylon (Hybond N+) selon la méthode décrite par Southern (1975). La fixation de l'ADN sur la membrane se fait par cuisson à 80°C pendant 2 h (Boehringer Mannheim Biochemica, 1993).

Marquage des sondes

Les sondes utilisées ont été marquées de deux façons différentes: radioactive et non radioactive. Le marquage radioactif a été réalisé au ³²P dCTP par la procédure d'amorçage aléatoire. La sonde marquée est purifiée par chromatographie à travers un gel de Sephadex G-50. Le marquage non radioactif a été réalisé par l'utilisation de la digoxygénine selon le protocole de Boehringer Mannheim. Les révélations des

hybridations ont été réalisées en utilisant un substrat chimiluminescent (Lumigen) (Boehringer Mannheim Biochemica, 1993 et Karcher, 1994).

Hybridations moléculaires

Les membranes de Nylon sont préhybridées à 65°C pendant une nuit dans du 6 x SSC, 5 x Denhardt, 0,1 % SDS et 1 mg/ml d'ADN du sperme du saumon. L'hybridation s'effectue pendant au moins 8 heures dans une solution semblable additionnée de la sonde marquée (20 ng/ml).

Détection des signaux

Pour détecter les signaux radioactifs, les filtres, légèrement séchés, sont exposés à 0°C au film Kodack XAR en utilisant un écran intensificateur. Le protocole de la détection chimiluminescente dérive de celui de Boehringer Mannheim (Bierwerth et al., 1992).

Estimation des distances génétiques et construction des arbres phylogénétiques

Pour l'estimation des distances génétiques, nous avons utilisé la méthode décrite par Nei (1972). Les arbres phylogénétiques ont été construits suivant la méthode UPGMA (Sneath et Sokal, 1973).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Analyse des profils des hybridations

Les hybridations moléculaires issues du marquage radioactif et du marquage non radioactif couplé à la chimioluminescence ont donné les mêmes résultats.

L'hybridation des profils de restriction Eco RI avec la sonde 8,2 Kb a révélé 17 fragments : un fragment majeur commun aux 12 Écotypes (E1) et plusieurs fragments polymorphes qui peuvent être propres à un seul Écotype ou commun à deux ou à plusieurs Écotypes. Par ailleurs, l'hybridation des profils de restriction Rsa I avec la même sonde a révélé 26 fragments. 6 d'entre eux sont communs à tous les Écotypes : 5 majeurs (R1, R22, R23, R25, R26) et 1 mineur (R24). Les autres fragments polymorphes sont propres à un seul Écotype ou communs à 2 ou à plusieurs Écotypes.

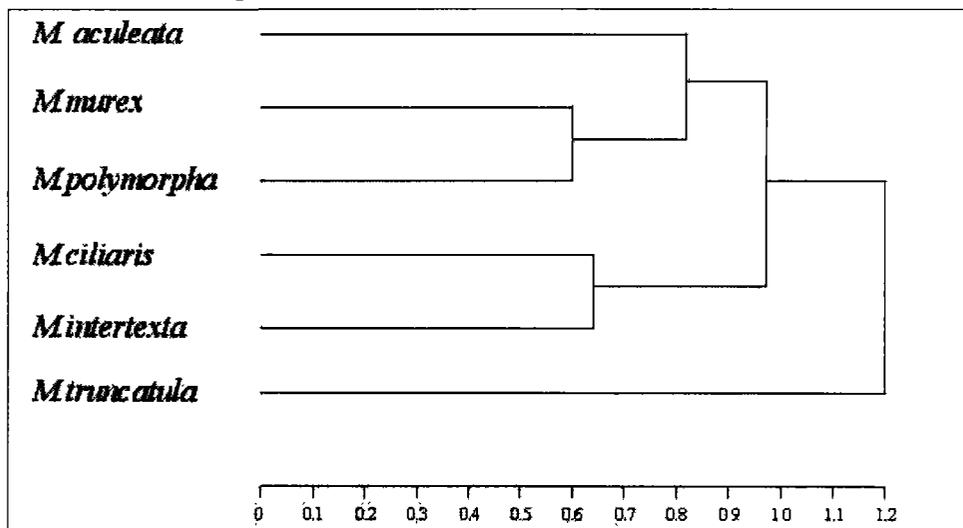
L'hybridation des profils de restriction Eco RI avec la sonde 18S a révélé 21 fragments: 1 fragment majeur commun à tous les Écotypes (E9) et plusieurs fragments polymorphes parmi lesquels on peut différencier des fragments propres à un ou à plusieurs Écotypes. L'hybridation des profils de restriction Rsa I avec la sonde 18S a révélé 15 fragments. 5 fragments sont communs à tous les cotypes : 4 majeurs (R1, R25, R23 et R22) et 1 mineur (R24). Parmi les dix fragments polymorphes on peut distinguer ceux qui sont propres à un ou à deux Écotypes et ceux qui sont communs à plusieurs Écotypes.

Analyse de la variabilité génétique au niveau des espèces:

Le polymorphisme RFLP, détecté par les sondes d'ADNr 8,2 kb et 18S chez les 6 espèces annuelles du genre *Medicago*, nous a permis d'estimer les distances génétiques séparant les différentes espèces prises 2 à 2. Les matrices des distances génétiques ont été calculées pour les quatre combinaisons principales (8,2 kb/EcoRI, 8,2 kb/Rsa I, 18S/Eco RI et 8,2 kb/Rsa I) ainsi que leurs combinaisons simultanées ([8,2 kb/Eco RI et 8,2 kb/Rsa I], [18S/Eco RI et 18S/Rsa I], [8,2 kb et 18S]).

La classification par dendrogramme (**figure 1**), basée sur la combinaison des données du gène 18S et de l'unité ribosomique 8,2 Kb, révèle l'individualisation de toutes les espèces (les nœuds sont situés au-delà de l'indice d'agrégation 0.6) bien qu'elles forment des groupements. On souligne ainsi l'isolement de l'espèce *M. truncatula* (section *pachyspireae*) à un niveau très précoce (nœud 1.19) alors que les autres espèces se scindent en deux groupes. Le premier groupe rassemble les espèces de la section *intertexteae* (*M. intertextata* et *M. ciliaris*) tandis que le second, isole l'espèce *M. aculeata* (section *pachyspireae*) de la classe formée par les espèces *M. polymorpha* (section *leptospireae*) et *M. murex* (section *pachyspireae*).

Figure 1. Dendrogramme correspondant au classement des espèces calculé sur la base de la matrice globale des deux sondes.



L'analyse des profils d'hybridation moléculaire des ADN ribosomiques révèle une grande variabilité interspécifique au sein du genre *Medicago*. L'utilisation d'une seule combinaison enzyme/sonde s'avère suffisante pour caractériser chacune des espèces étudiées. Chaque espèce présente en effet des profils caractéristiques susceptibles de la discriminer des autres espèces. Par ailleurs, le dendrogramme établi sur la base des données des 2 sondes ribosomiques 8,2 Kb et 18S est très partiellement en accord avec la classification botanique (Lesins et Lesins, 1979). Cependant, il concorde avec les données isoenzymatiques obtenues par El Mousadik (1991) au niveau des affinités intergroupes (cas du regroupement de l'espèce *M. murex* de la section *Pachyspireae* avec *M. polymorpha* de la section *Leptospireae*) et au niveau du regroupement des espèces de la même section (cas des espèces *M. intertextata* et *M. ciliaris* qui appartiennent à la section *Intertexteae*).

Les écotypes de chaque espèce étudiée ont été choisis arbitrairement. La plupart des Écotypes sont locaux et spontanés. Deux uniquement sont des cultivars étrangers (*M. murex* zodiac et *M. truncatula* jemalong). Cette diversification dans les origines des Écotypes nous a permis d'analyser d'une part l'influence des facteurs éco-géographiques sur les divergences entre les populations sauvages et d'autres part l'impact de la sélection artificielle sur la diversité génétique intraspécifique. L'exemple type de l'influence éco-géographique est illustré par l'espèce *M. aculeata*. En effet, les profils d'hybridation des ADN ribosomiques ont révélé un large polymorphisme

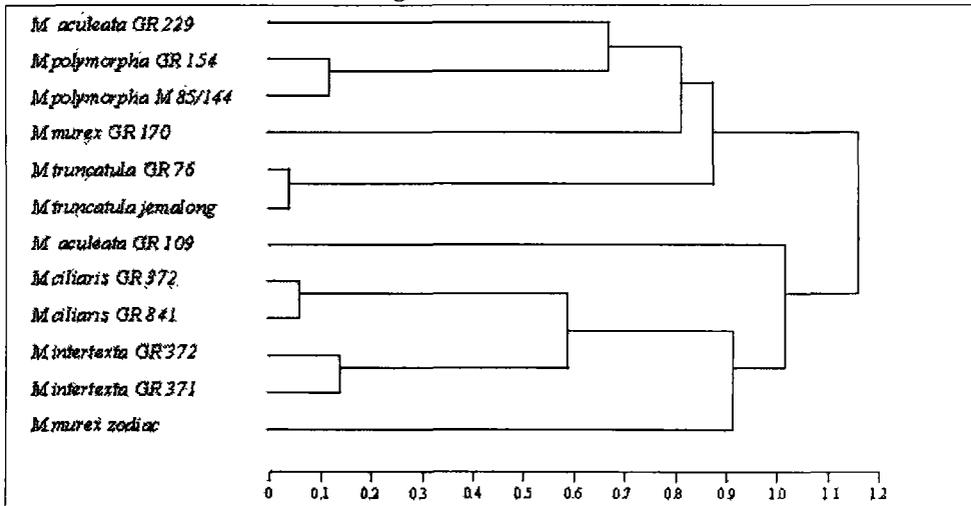
intraspécifique. Chaque écotype présente 1 ou 2 profils (selon la sonde) caractéristiques et sans analogues au sein de l'autre écotype.

En ce qui concerne l'influence de la sélection artificielle, elle peut être élucidée par l'espèce *M. murex*. En effet, l'écotype étranger zodiac ($2n=16$) montre 2 types de profils avec l'enzyme Eco RI (un profil plus représenté que l'autre). L'écotype local GR170 ($2n=14$) présente quant à lui 2 autres profils. Il n'y a aucune identité entre les 4 profils présentés par les deux écotypes. La diversité génétique intraspécifique est alors très importante.

Analyse de la variabilité au niveau des populations

Les matrices de distances génétiques inter-populations propres aux mêmes combinaisons étudiées à l'échelle spécifique ont été calculées. Le dendrogramme synthétique (**figure 2**) permet de souligner la forte ressemblance entre les Écotypes de la même espèce (*M. truncatula*, *M. ciliaris*, *M. intertexta* et *M. polymorpha*). Cependant, les espèces *M. aculeata* et *M. murex* marquent des divergences intraspécifiques importantes à cause de certains allèles caractéristiques. Leurs Écotypes correspondants se trouvent ainsi séparés et isolés chacun dans un groupe.

Figure 2. Dendrogramme correspondant au classement des populations calculé sur la base de la matrice globale des deux sondes.



CONCLUSION

Les profils RFLP, en plus de leur exploitation dans l'analyse de la variabilité génétique, peuvent être utilisés pour identifier et cartographier des loci affectant des caractères quantitatifs d'intérêt agronomique. Aussi, la relation existante entre le comportement de divers Écotypes aux facteurs édapho-climatiques et leurs origines géographiques peut être exploitée pour développer et sélectionner des cultivars adaptés aux différentes régions. Il est, par ailleurs, possible de réaliser des hybridations intraspécifiques (cas des Écotypes spontanés de *M. aculeata*) et interspécifiques (*M. truncatula* x *M. littoralis*). Ces croisements favorisent le maintien de la diversité génétique et le transfert de gènes de résistance.

Sur le plan technique, l'utilisation du marquage non radioactif à la chimiluminescence est une très bonne alternative pour palier les inconvénients du marquage radioactif.

Bibliographie

1. BIERWERTH S., KAHL G., WEIGAND F., WEISING K., 1992 : Oligonucleotide fingerprinting of plant and fungal genomes: a comparison of radioactive, colorigenic and chemiluminescent detection methods. *Electrophoresis*, 13: 115-122.
2. BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1993 : The DIG system user's guide for filter hybridization: 90 p.
3. DELLAPORTA S.L., WOOD J., HICKS J.B., 1983 : A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1: 19-21.
4. EL MOUSADIK A., 1991 : Analyse de la variabilité génétique des Écotypes marocains du genre *Medicago*, implication en gestion des ressources phylogénétiques. Thèse option génétique. Fac. Sci. Rabat.
5. FAIVRE-RAMPANT P., BODERGAT R., BERVILLÉ A., 1992 : Une méthode moléculaire de classement des clones de peupliers (*Populus*) dans les sections *Tacamahaca*, *Aigeiros*, *Leuce* et *leucoïdes* par des fragments de restriction des unités ribosomiques. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 315, Série III : 133-138.
6. JEANDROZ G., FAIVRE-RAMPANT F., PUGIN A., BOUSQUET J., BERVILLÉ A., 1995 : Organization of nuclear ribosomal DNA and species-specific polymorphism in closely related *Fraxinus excelsior* and *F. Oxyphylla*. *Theor Appl. Genet.*, 91: 885-892.
7. KARCHER S.J., 1994 : Non radioactive nucleic acid detection systems. *Plant Molecular Biology Manual*, F3: 1-25.
8. KABBAJ A., ZEBOUDJ F., PELTIER D., TAGMOUNT A., TERSAC M., DULIEU H., BERVILLÉ A., 1995 : Variation and phylogeny of the ribosomal DNA unit types and 5S DNA in *Petunia jussieu*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42: 311-325.
9. LESINS K.A., LESINS I., 1979 : Genus *Medicago* (Leguminosae). A taxogenetic study. Dr. W. Junk, the Hague Boston. London.
10. NEI M., 1972 : genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106 : 283-292.
11. Primard C., 1985: Divergences morphologiques et divergences moléculaires: estimation des divergences au niveau des molécules d'ADN. Dans « Les distances génétiques. Estimations et applications ». Eds. Lefort-Boson M. et De Vienne D., : 81-105.
12. SNEATH P.H.A., SOKAL R.R., 1973 : Numerical taxonomy, San Fransisco : Free-man.
13. SOUTHERN E.M., 1975 : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.
14. ZEBOUDJ F., KABBAJ A., SOSSEY ALAOUI K., PELTIER D., TAGMOUNT A., RAQUIN C., DARMENCY M., MAIZONNIER D., DULIEU H., BERVILLÉ A., 1994 : Variation of ribosomal DNA and inheritance of polymorphisms in 6 *Petunia hybrida* hort lines. *Agronomie*, 14: 485-495.

D3 : Applications des marqueurs moléculaires à l'étude de la résistance aux virus de la mosaïque jaune et de la jaunisse nanisante chez l'orge

BENSALAH B.^{1,2,3}, STEYER S.¹, FROIDMONT F.¹, JACQUEMIN J.M.¹

¹ Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat- Gembloux, Belgique; ² Faculté des Sciences Agronomiques- Gembloux, Belgique; ³ SCSP (DPVCTRF), Rabat, Maroc.

INTRODUCTION

Chez l'orge, les virus de la mosaïque jaune (VMJO = virus de la mosaïque jaune et VMMO = virus de la mosaïque modérée) et le virus de la jaunisse nanisante (VJNO) retiennent particulièrement l'intérêt tant des chercheurs que des agriculteurs. Ces virus sont responsables de maladies présentant une incidence économique majeure pour la culture de l'orge. La jaunisse nanisante peut causer des dégâts importants chez toutes les céréales cultivées, tandis que la mosaïque jaune représente l'une des plus importantes maladies des orges d'hiver en Europe et en Asie du Sud-Est (Kaiser et Friedt, 1992).

Les virus concernés possèdent une grande complexité, eu égard à la variabilité des souches, ainsi qu'à la diversité des relations avec leurs vecteurs de transmission et leurs hôtes. La mosaïque jaune de l'orge, transmise par *Polymyxa graminis* Led. et spécifique du genre *Hordeum* (Adams *et al.*, 1988), est causée par deux virus distincts (Adams *et al.*, 1987 ; Laing et Coutts, 1988 ; Huth et Adams, 1990 ; Kashiwazaki *et al.*, 1989): le virus de la mosaïque modérée (VMMO ou BaMMV) et le virus de la mosaïque jaune (VMJO ou BAYMV). Des études récentes effectuées dans plusieurs pays d'Europe, ont montré l'existence de nouvelles souches virales, capables de surmonter le gène *ym4* exploité jusqu'ici en Europe (Huth, 1991; Hariri *et al.*, 1990 ; Froidmont *et al.*, 1993 ; Kummert, 1993 ; Steyer *et al.*, 1995). Ce gène de résistance *ym4*, localisé sur le bras long du chromosome 3 (Friedt *et al.*, 1990 ; Kaiser et Friedt, 1992) est utilisé depuis plusieurs années avec succès en sélection. Une sonde MWG 10 marque ce gène et permet de différencier les plantes sensibles des résistantes (Graner et Bauer 1993).

Le virus de la jaunisse nanisante de l'orge, décrit par Oswald et Houston en 1951, est transmis par plusieurs espèces de pucerons. Bien que limité aux graminées, le VJNO, grâce à l'amplitude de sa gamme d'hôtes, ainsi qu'à leur diversité, peut se multiplier sous diverses conditions environnementales. La jaunisse nanisante constitue l'une des maladies des céréales les plus difficiles à étudier à cause des interactions biologiques complexes existant entre la plante-hôte, le virus et les pucerons vecteurs (Qualset, 1984). Un gène *Yd2*, localisé sur le chromosome 3 de l'orge (Schaller *et al.*, 1964) et conférant la tolérance à ce virus, est largement utilisé en sélection.

La recherche de génotypes d'orge résistants à ces virus, constitue l'une des mesures de contrôle les plus intéressantes par ses aspects économique et écologique. Le développement des marqueurs moléculaires et leur application à la sélection permet de mettre ces résistances en évidence, indépendamment des interactions du milieu. Une étape de recherche de liaisons entre ces marqueurs moléculaires et des gènes à valeur agronomique est cependant nécessaire. Le présent travail a, en effet, pour objet de caractériser par des marqueurs moléculaires des gènes de résistance à la jaunisse nanisante et à la mosaïque jaune de l'orge.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal, virus et vecteur de transmission

Dans le cas de la mosaïque jaune de l'orge (MJO), 26 génotypes d'orge ont été caractérisés par hybridation moléculaire de type « Southern blot », à l'aide de la sonde MWG10. La descendance F₂, issue du croisement entre la lignée résistante 'L 541' et la variété sensible 'Travelling', ainsi que les parents ont été semés au champ à Gembloux et à Huccorgne, infectés respectivement par le VMMO, le VMJO et par ces deux derniers et le nouvel isolat VMJO-EH (souche VMJO, isolée à Huccorgne (H) à partir de la variété 'Express').

L'évaluation du polymorphisme entre les lignées 'CF 91.51', '5607.042', '6258.002' et la variété 'Puffin', choisies parmi le matériel végétal de la Station d'Amélioration des Plantes de Gembloux pour leur résistance ou leur sensibilité au VJNO et pour leur valeur brassicole, a été réalisée. 'CF 91.51' et '6258.002' représentent les lignées parentales résistantes au VJNO. La descendance F₂, composée de 88 plantes et issue du croisement « CF91.51 » x « 5607.042 », a été utilisée dans l'étude de la ségrégation pour la résistance au VJNO-PAV et à l'analyse de liaison.

Le vecteur *Rhopalosiphum padi* a servi, dans ce travail, pour la transmission de la souche VJNO-PAV, isolée à Gembloux.

Clones RFLP et analyse de liaison

Trente-trois clones, hybridant à des loci sur le groupe de liaison 3 des *triticeae* et fournis par différents laboratoires, ont été utilisés comme sondes pour identifier des loci RFLP liés au gène Yd2. Ces clones sont issus de différentes banques d'ADN génomique (ABG, et MWG) ou de banques ADNc (BCD, ABC, CDO) d'orge et d'avoine. D'autres clones (WG, PSR) proviennent de banques génomiques de froment.

L'analyse de liaison dans la descendance F₂ du croisement 'CF51.91' x '5607.042' a été réalisée à l'aide du logiciel Mapmaker version II (Lander *et al.*, 1987). Les valeurs de recombinaison sont converties en centimorgans par l'application de la fonction Kosambi (Kosambi, 1944).

Extraction de l'ADN génomique de l'orge, digestion et hybridation moléculaire

Chaque échantillon de 0.5 à 1 g de feuilles, est broyé dans de l'azote liquide et resuspendu dans 10 ml de tampon d'extraction (100 ml Tris-HCl, 100 ml NaCl, 50 ml EDTA, SDS 2 %, pH 8,0). Après une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 : 24 : 1), l'ADN est précipité à l'isopropanol (0,6 vol). Il est resuspendu dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) et incubé pendant 1 h à 37 °C en présence de RNase A (25 µg/ml). Une autre extraction au phénol-chloroforme est réalisée, suivie d'une extraction au chloroforme. L'ADN est mis en solution dans du TE et conservé à 4°C.

L'ADN génomique (10 µg) des différentes variétés-parents ainsi que celui des plantes F₂ (7-10 µg) est mis à digérer dans un volume de 50 µl en présence de 35 à 50 unités de l'enzyme de restriction appropriée et à la température requise. Après électrophorèse sur gel de 0,8 % d'agarose et traitement du gel, le transfert southern des fragments d'ADN est effectué par capillarité en 20x SSC sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond N⁺, Amersham). L'ADN est fixé irrévocablement sur la membrane en traitant cette dernière avec une solution NaOH 0.4 M.

Le fragment d'ADN à utiliser comme sonde est isolé de son plasmide et marqué en présence de 40 μCi d' $\alpha^{32}\text{PdCTP}$ (3000 μCi / mmole) selon la méthode de marquage par élongation d'amorces aléatoires (protocole du « Random Primed DNA Labeling Kit » de Boehringer). L'hybridation est réalisée dans 5x SSC pendant 16 h à 65 °C et les filtres sont lavés successivement en 2x SSC, 0,1 % SDS, en 1x SSC, 0,1 % SDS et finalement mis en autoradiographie durant 8-10 jours.

RÉSULTATS

Mosaïque jaune de l'orge

• Analyse des géotypes d'orge résistants au VMMO, au VMJO et au VMJO-EH par marquage moléculaire

Une évaluation de la résistance chez 26 géotypes d'orge d'origine différente vis-à-vis du complexe des virus de la mosaïque jaune a été effectuée au champ, dans deux localités (Huccorgne et Gembloux). Les résultats portant sur notre analyse de ces différents géotypes par hybridation moléculaire, ainsi que leur statut de résistance ou sensibilité dans les deux sites d'essai sont synthétisés au tableau 1. À Huccorgne, seulement 5 cultivars et/ou lignées présentent des réactions sérologiques avec les anticorps monoclonaux dressés contre le VMMO et le VMJO ; 12 cultivars extériorisent des symptômes de mosaïque tandis que 9 autres cultivars et/ou lignées ne montrent pas de symptômes.

En effet, les cultivars et lignées « L541 », « RDA72.49 », « Jochiweon covered », « Comte de Serres », « Marne », « Escourgeon de Champagne », « Super Champenois », « Ile de Ré » et « Mushinchiang 3 » sont résistants au VMMO, VMJO et au nouvel isolat VMJO-EH, tandis que « Neger » et « Mielmont » étaient sensibles à ce complexe de virus, montrant des réactions similaires à celles présentées par les témoins sensibles « Gerbel », « Arton » et « Truitel ». Les cultivars « Express », « L 28.28 », « Bison », « Franka », « Torrent », « Mélusine », « Target », « Nordic », « Énergie », « Turkey524 », « Gaulois » et « Hatif de Grignon » sont résistants aux souches communes (VMMO et VMJO) présentes à Gembloux mais sont sensibles à Huccorgne au VMJO-EH.

L'ADN extrait de ces différents géotypes d'orge et digéré par l'enzyme BamH1, a été hybridé à la sonde MWG10. Comme l'ont observé Graner et Bauer (1993), la sonde MWG10 détecte chez les géotypes portant le gène *ym4* (« Express », « Franka »...) une bande à 1,8 kb, caractérisant le phénotype résistant, tandis qu'une bande située à 2,2 kb est observée chez les variétés sensibles telles que « Truitel », « Arton » ou « Gerbel ».

Les résultats obtenus lors de l'analyse des différents géotypes par hybridation moléculaire (figure 1) confirment ceux de Graner et Bauer. Ils montrent, en effet, que chez les géotypes « Express », « Mélusine », « Target », « L 28.28 », « Bison », « Gaulois », « Torrent », « Nordic », « Franka » et « Énergie », la sonde MWG10 détecte une bande à 1.8 kb, caractérisant les géotypes portant le gène *ym4*.

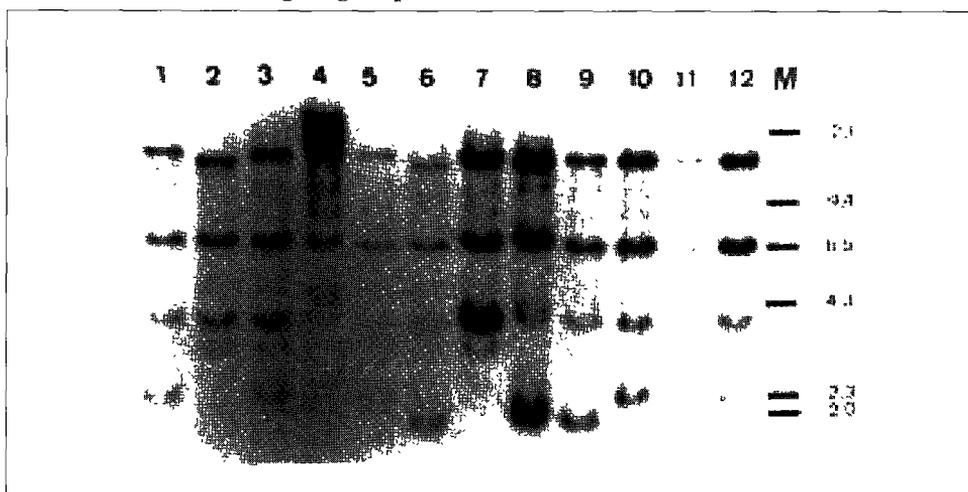
En outre, nous avons mis en évidence chez les géotypes « Jochiweon covered », « L541 » et « RDA72.49 », la présence d'une nouvelle bande située à 2,7 kb, avec absence de la bande de 1,8 kb. La bande située à 2,7 kb doit donc correspondre à l'allèle de résistance vis-à-vis des types viraux de la mosaïque jaune présents à Gembloux et à Huccorgne, chez ces trois géotypes.

La sonde MWG10 détecte aussi chez les anciennes variétés « Comte de Serres », « Marne », « Escourgeon de Champagne », « Super Champenois », « Ile de Ré » et « Mushinchiang 3 » résistantes aux virus VMMO et VMJO et à la souche VMJO-EH,

une bande à 2,2 kb indiquant la présence de l'allèle de sensibilité au locus *ym4*, mais ne met pas en évidence de bande particulière susceptible de correspondre au gène responsable de la résistance chez ces variétés, laquelle résistance serait dès lors distincte de celle conférée par *ym4*. Des résultats analogues ont été obtenus pour les variétés « Hâtif de Grignon » et « Turkey 524 », résistantes aux souches communes VMMO et VMJO.

Par ailleurs, nous avons observé chez « RDA72.49 » la présence de 2 allèles, celui de sensibilité (2,2 kb) et celui de résistance (2,7 kb), indiquant un état hétérozygote.

Figure 1. Autoradiographie après analyse Southern par la sonde MWG10 de l'ADN de variétés d'orge digéré par BamHI.



1 : Turkey 524 ; 2 : Jochiweon Covered ; 3 : RDA 72 49 ; 4 : Ile de Ré ; 5 :

Escourgeon de Champagne ; 6 : L 28-28 ; 7 : L 541 ; 8 : Franka ; 9 : Express ; 10 : Travelling ; 11 : Truitel ; 12 : Gerbel ; M : marqueur : ADN digéré Hind III.

• *Analyse de la descendance F_2 issue du croisement 'L 541' (Pr) x 'travelling' (Ps)*

Pour identifier le mode d'hérédité du nouveau caractère de résistance aux virus de la mosaïque jaune de l'orge, nous avons analysé la descendance F_2 du croisement entre « L541 » (parent résistant) et « Travelling » (parent sensible). La descendance F_2 a été testée en champ infecté par les souches communes (VMMO, VMJO) à Gembloux et en champ infecté par ces mêmes souches communes et la nouvelle souche VMJO-EH à Huccorgne, avec évaluation des symptômes et quantification sérologique des virus par le test Elisa.

Sur base des symptômes, le taux global d'infection est semblable à Gembloux et à Huccorgne ($\approx 74\%$) : nos résultats montrent que la ségrégation observée, aussi bien à Gembloux qu'à Huccorgne, est compatible avec le rapport 1R: 3S, impliquant un gène unique et récessif ($\chi^2 = 0.013$ à Gembloux et 0.012 à Huccorgne).

Les résultats obtenus en Elisa indiquent qu'à Gembloux, 65,7 % et 38,2 % des plantes F_2 sont infectées respectivement par le VMMO et le VMJO, tandis que le taux des infections mixtes est de 34,3 %. L'infection par l'un ou l'autre virus, correspond à un taux de 69,6 % des 102 plantes testées.

À Huccorgne, il résulte des tests sérologiques que 15,1 % et 36,8 % des plantes F_2 sont respectivement infectées par VMMO et VMJO et seulement 6,6 % des plantes

montrent une infection mixte par les souches communes VMMO et VMJO. 45,3 % des plantes F₂ sont infectées à Huccorgne par le VMMO ou le VMJO ou par les deux virus.

Du fait de l'absence de réaction sérologique chez 28 plantes (26,4 %) présentant des symptômes de mosaïque, le mode d'hérédité de la résistance au complexe viral de la mosaïque jaune, à Huccorgne, ne peut être déterminé sur la base du test Elisa tant qu'un antisérum dressé contre l'isolat viral VMJO-EH n'est pas disponible.

Pour comparer les observations des symptômes au champ et les résultats des tests sérologiques effectués sur la descendance F₂ (à Gembloux et à Huccorgne) à l'analyse moléculaire, nous avons réalisé l'hybridation de la sonde MWG10 à l'ADN de chaque plante F₂ des 2 populations testées à Gembloux et à Huccorgne. Sur base de l'analyse de ségrégation du marqueur MWG10 dans la F₂ ségrégeant pour la résistance au complexe viral de la mosaïque jaune de l'orge, nos résultats montrent qu'à Gembloux, 20,6 % des plantes F₂ ont le génotype du parent résistant ('L 541'), 22,5 % ont celui du parent sensible ('Travelling') et 56,8 % sont des recombinants. Sept plantes (6,9 %) sont hétérozygotes, bien que sur base des symptômes et des tests sérologiques, elles ont été notées résistantes. A Huccorgne, 24,5 % ont le gène de résistance identifié par la bande de 2,7 kb, 28,4 % ont l'allèle de sensibilité et 47,1 % sont des hétérozygotes. 4,9 % des plantes (5 plantes) classées comme résistantes, étaient aussi hétérozygotes. La ségrégation observée est compatible avec le rapport 1 : 2 : 1 ($\chi^2 = 0,67$ à Huccorgne et 2,0 à Gembloux à $p = 0,05$) indiquant que la résistance aux souches communes (VMMO et VMJO), ainsi qu'au VMJO-EH à Gembloux et à Huccorgne est sous contrôle d'un gène récessif unique.

Tableau 1 : Réactions des différentes lignées ou variétés d'orge à Huccorgne et à Gembloux ; taille du fragment spécifique obtenu après digestion de l'ADN génomique par BamHI et hybridation avec la sonde MWG010.

Variétés et lignées testées	Huccorgne	Gembloux	taille du fragment spécifique (kb)
JOCHIWEON COVERED	R	R	2.7
MUSHINCHIANG 3	R	R	2.2
TURKEY 524	S	R	2.2
EXPRESS	S	R	1.8
MELUSINE	S	R	1.8
TARGET	S	R	1.8
L28.28	S	R	1.8
HATIF DE GRIGNON	S	R	2.2
MARNE	R	R	2.2
BISON	S	R	1.8
ILE DE RE	R	R	2.2
ESCOURGEON DE CHAMPAGNE	R	R	2.2
GAULOIS	S	R	1.8
COMTE DE SERRES	R	R	2.2
FRANKA	S	R	1.8
L541	R	R	2.7
ARTON	S	S	2.2
RDA72.49	R	R	2.7-2.2
NEGER	S	S	2.2
TORRENT	S	R	1.8
GERBEL	S	S	2.2
TRUITEL	S	S	2.2
MIELMONT	S	S	2.2
NORDIC	S	R	1.8
ENERGIE	S	R	1.8
SUPER CHAMPENOIS	R	R	2.2

R = résistant.

S = Sensible.

Jaunisse nanisante de l'orge

La recherche de liaisons génétiques entre des marqueurs de type RFLP et le gène Yd2 de résistance au virus de la jaunisse nanisante de l'orge (VJNO), localisé sur le chromosome 3, est entreprise par l'étude de ségrégation pour la résistance au VJNO et de ces marqueurs au sein d'une population F₂

- *Sondes détectant un polymorphisme de restriction entre les lignées du croisement 'CF91.51' x '5607.042'*

L'ADN génomique des variétés et lignées constituant les différents croisements réalisés a été clivé par 34 enzymes de restriction (EcoRI, HindIII, EcoRV, DraI, BglII, PvuII, SacI, XbaI, BamHI, SspI, ApaI, KpnI, PstI, ScaI, NdeI, XhoI, SmaI, BclI, HpaI, ClaI, StuI, SmaBI, PmaCI, EcoRII, NheI, PvuI, SpeI, ApaLI, NcoI, NsiI, BsiMI, BspM90I, Bsp119I, SpHI) et hybridé à 33 sondes.

L'hybridation de ces sondes à l'ADN génomique de 4 variétés/lignées parentales de deux croisements, après restriction, a mis en évidence des profils d'hybridation spécifiques pour ces variétés /lignées étudiées.

Pour l'orge, espèce diploïde, les sondes à « copie unique » présenteront en « Southern blot » un profil d'hybridation à l'ADN constitué d'un seul signal correspondant au génome de cette espèce. Ainsi, parmi les sondes testées, la presque totalité sont soit à « copie unique », soit « peu répétées » et trois sondes seulement sont des sondes « multicopies » (KSUA3C, KSUF2B, PSR56) présentant des profils complexes difficiles à interpréter.

Au total, 17 sondes (51,5 %) montrent respectivement des fragments d'ADN polymorphes entre les parents du croisement 'CF91.51' x '5607.042' avec au moins une enzyme de restriction. Les sondes, révélant du polymorphisme entre les couples de lignées considérées, sont en majorité constituées de fragments d'ADN génomique d'orge (70,6 %).

Les sondes polymorphes sont hybridées à l'ADN de 88 plantes F₂, issues de ce croisement et à celui des parents, digérés par l'enzyme adéquate. La ségrégation des signaux obtenus au sein de cette population F₂ est analysée.

- *Ségrégation pour la résistance au VJNO dans la descendance F₂ issue du croisement 'CF91.51' x '5607.042'.*

L'infection a été effectuée en conditions contrôlées sous serre sur les plantes F₂ du croisement « CF91.51 » x « 5607.042 ». La transmission de l'isolat PAV par le vecteur *R. padi* aux plantes F₂ et aux 2 parents, au stade 2-3 feuilles, a permis de vérifier l'expression phénotypique du gène Yd2 de résistance au VJNO sur ces plantes. Les résultats obtenus avec le test Elisa, effectué sur racines, 14 j après inoculation de ces plantes, ainsi que l'observation des symptômes permettent de différencier les plantes résistantes et les plantes sensibles.

Il ressort des résultats obtenus en Elisa que les valeurs moyennes sont de 0,142 pour la descendance F₂, de 0,018 pour le parent résistant (« CF91.51 ») et de 0,132 pour le parent sensible (« 5607.042 »). Ces valeurs montrent, en effet, des différences significatives entre les 2 parents ainsi qu'au niveau de la descendance F₂. En effet, l'analyse de la population F₂ par sérologie présente respectivement des minima de 0,001 et des maxima de 0,573, indiquant un étalement des valeurs Elisa et mettant en évidence une ségrégation de la résistance au VJNO au sein de la population F₂.

Le pourcentage de plantes infectées a été calculé sur la base du test Elisa (au seuil de $A_{405} = 0,054$) : dans le cas de la population F_2 , celui-ci est de l'ordre de 67,9 %. Il est de 5,3 % pour le parent résistant et de 97,1 % 0,054 pour le parent sensible.

L'analyse par le test χ^2 aussi bien sur base des symptômes ($\chi^2=1,44$ à $p=0,05$) que sur base du test Elisa ($\chi^2=2,68$ à $p=0,05$) montre qu'on peut attribuer la résistance à l'action d'un gène récessif puisque, pour cette population F_2 , la ségrégation observée est compatible avec le rapport 1R : 3 S. Ainsi, le contrôle génétique de la résistance apparaît monogénique et récessif chez la lignée 'CF91.51'. Le bon comportement de résistance de cette lignée lors des infections implique une résistance à la multiplication du VJNO-PAV car les plantes contrôlées montrent une faible concentration en virus.

• *Analyse de ségrégation des marqueurs dans la descendance F_2 issue du croisement 'CF91.51' x '5607.042' et distances génétiques*

Les clones mettant en évidence du polymorphisme entre les parents du croisement 'CF91.51' x '5607.042' sont utilisés dans l'analyse « Southern » de l'ADN de 88 plantes F_2 pour l'étude de ségrégation. La figure 2 montre la ségrégation du marqueur ABG453 dans la descendance F_2 ségrégeant pour la résistance au VJNO.

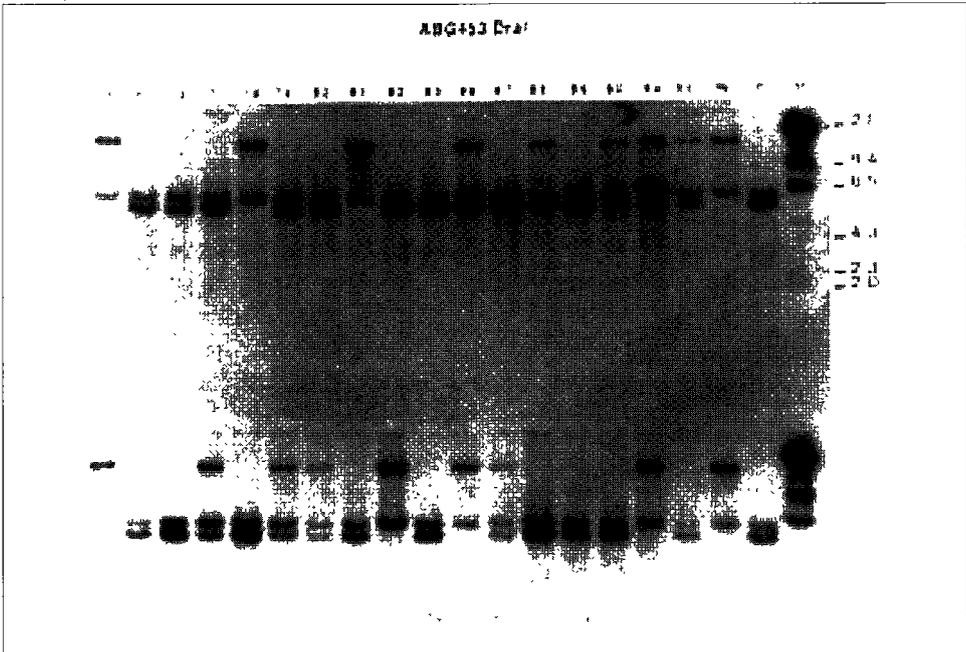


Figure 2. Ségrégation du marqueur ABG 453 dans la descendance F_2 .

Pr : parent résistant ; Ps : parent susceptible ; 12-113 : plantes.

Le test χ^2 a été utilisé pour déterminer le meilleur ajustement des données de ségrégation au rapport théorique 1:2:1 attendu. Huit des 13 loci montrent une déviation vis-à-vis du rapport attendu ($p < 0.05$). La plupart de ces loci ont un excès de l'un ou l'autre parent, alors que les autres loci ont un nombre d'hétérozygotes en excès (tableau 2). Ces loci présentent donc des profils de ségrégation déviés. Le gène Yd2 de résistance au VJNO ségrège comme caractère monogénique et ne dévie pas du rapport théorique 1:3 attendu.

Tableau 2. Ségrégation du gène Yd2 et de 12 marqueurs dans la descendance F₂ issue du croisement « CF91.51 » x « 5607.042 ».

Population F ₂ du croisement « CF 91.51 » x « 5607.042 »									
		A	B	H	'-'	Rapport théorique	χ^2	P	N
Yd2-E	Test Elisa	24	64	0	0	1-3	0.24	0.60-0.70	88
Yd2-S	Symptomatologie	27	61	0	0	1-3	1.23	0.20-0.30	88
Marqueurs/ enzyme	MWG595/XbaI	23	21	42	2	1-2-1	0.15	0.90-0.95	86
	MWG582/XbaI	24	23	40	1	1-2-1	0.59	0.70-0.80	87
	BCD828/BamHI	29	14	27	18	1-2-1	10.08	0.001-0.005	70
	ABG453/DraI	38	12	28	10	1-2-1	23.54	<0.0005	78
	MWG973/ApaLI	35	20	18	15	1-2-1	24.92	<0.0005	73
	MWG803/NcoI	29	24	30	5	1-2-1	6.98	0.025-0.05	83
	ABG396/HindIII	28	33	20	7	1-2-1	21.38	<0.0005	81
	KsuA3C/DraI	33	14	32	9	1-2-1	11.99	0.001-0.005	79
	Dor 4 /ApaLI	22	22	39	5	1-2-1	0.34	0.80-0.90	83
	WG110 /DraI	31	15	33	9	1-2-1	8.62	0.005-0.01	79
	PSR394 /SacI	25	24	18	21	1-2-1	14.37	0.0005-0.001	67
	MWG584 /EcoRV	55	6	22	5	1-2-1	76.18	<0.0005	83

Yd2-S = ségrégation du gène Yd2 de résistance au VJNO dans la population F₂ sur base de la symptomatologie

Yd2-E = ségrégation du gène Yd2 sur base du test Elisa.

• *Distances génétiques et établissement de la carte de liaison à partir de la ségrégation des marqueurs dans la descendance F₂ du croisement 'CF91.51' x '5607.042'*

Les tests de liaison entre marqueurs et leur localisation les uns par rapport aux autres ont été réalisés à l'aide du programme Mapmaker en comparant les données phénotypiques recueillies dans le cas du gène Yd2 à celles des RFLP.

- *Distances génétiques*

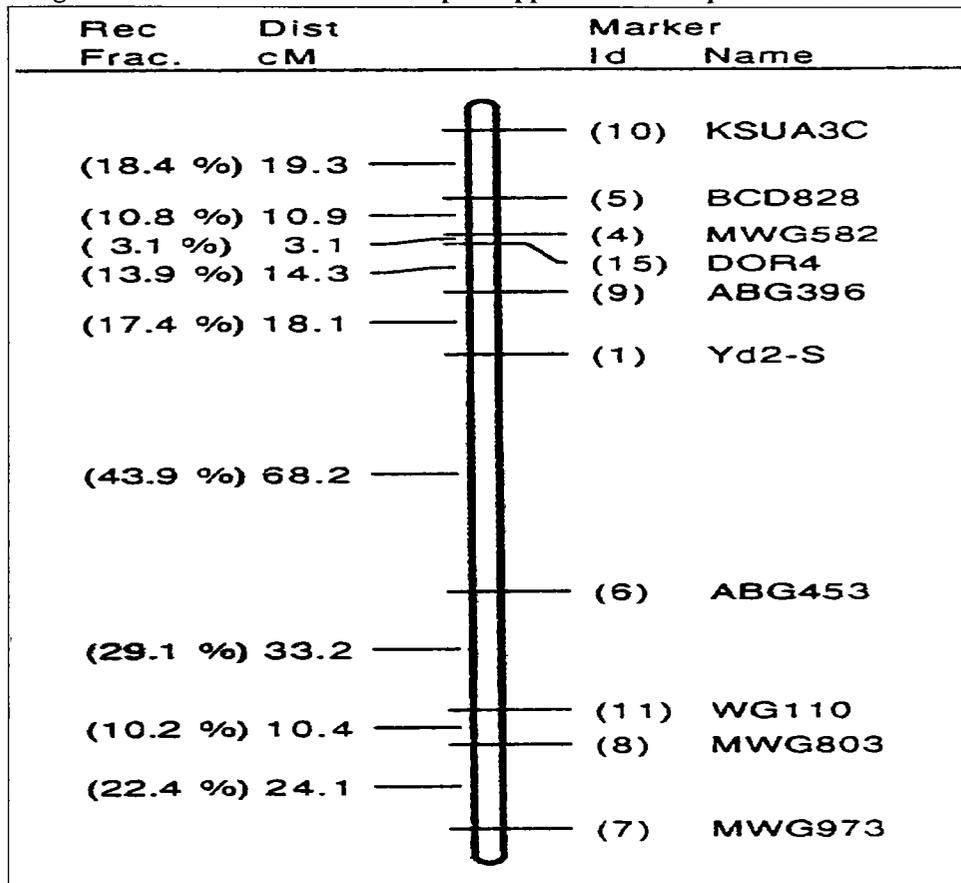
L'analyse « deux points » nous a permis de déterminer la fraction de recombinaison θ et le lodscore associés aux couples de marqueurs liés. Les loci sont considérés non liés si le lodscore est < à 3,0 (une vraisemblance < à 1000 contre 1) et un $\theta \geq$ à 0,4.

L'ordre le plus probable et la localisation des 13 loci les uns par rapport aux autres ont été établis par une analyse multipoints. Cette dernière considère tous les loci et détermine l'ordre des loci compatibles avec les résultats obtenus dans l'analyse « trois points ».

- Établissement de la carte de liaisons génétiques

Sur base de l'analyse multiple de liaison du programme Mapmaker, la carte de liaison génétique pour les marqueurs RFLP et le locus Yd2, ségrégeant au sein de la population F₂ issue du croisement 'CF91.51' x '5607.042', a été dressée (figure 3). Sur cette carte, le gène Yd2 de résistance au VJNO est situé dans la région centromérique proche du marqueur ABG396.

Figure 3. Carte de liaison génétique du chromosome 3 de l'orge avec localisation du gène Yd2 de résistance au VJNO par rapport à des marqueurs de référence.



DISCUSSION

L'utilisation de la sonde MWG10 nous a permis de mettre en évidence un marqueur lié au gène récessif de résistance chez 3 génotypes résistants au complexe viral de la mosaïque jaune de l'orge (« L 541 », « RDA 72.49 » et « Jochiweon covered ») tout en montrant pour d'autres génotypes résistants (« Comte de Serres », « Marne », « Mushinchiang 3 », « Turkey 524 », « Hâtif de Grignon », « Escourgeon de Champagne », « Ile de Ré », « Super Champenois »), une hérédité de la résistance sous contrôle d'un déterminisme génétique différent de celui détecté par la sonde MWG10.

Notre étude confirme les résultats de Graner et Bauer (1993). L'analyse RFLP, utilisant la sonde MWG10, a montré une parfaite discrimination entre les génotypes résistants et sensibles, corrélée avec le phénotype des cultivars testés. À Huccorgne, les résultats des tests Elisa ne sont pas corrélés à l'observation des symptômes, du fait de la présence de l'isolat particulier VMJO-EH vis-à-vis duquel on ne dispose pas encore d'anticorps pour la détection sérologique. Des symptômes de mosaïque, correspondant vraisemblablement à la souche 'Express', ont été observés sur 28 plantes (26,4 %), en l'absence de réactions sérologiques.

Le VMJO est présent dans des proportions similaires dans les deux essais de Gembloux et de Huccorgne (38,2 % et 36,8 %). Le taux des infections mixtes (VMMO et VMJO) est significativement plus élevé à Gembloux (34,3 %) qu'à Huccorgne (6,6). Le faible nombre de plantes où la présence simultanée des 2 virus a été décelée pourrait être dû à un faible inoculum en VMMO au moment de prélèvement des échantillons (fin avril), du fait qu'il s'agit d'un virus thermophile, mis en évidence plus tardivement que le VMJO dans les plantes virosées.

Actuellement, la résistance chez les cultivars adaptés est principalement basée sur le gène ym4 qui est efficace vis-à-vis uniquement du VMMO et du VMJO. La lignée 'L 541', immune aux trois souches virales et qui porte le gène identifié par la bande 2,7 kb et localisé au locus ym4 sur le chromosome 3L, pourrait être utilisée en tant que géniteur de résistance dans un programme de sélection.

À côté des schémas classiques d'amélioration des plantes, la sélection assistée par marquage moléculaire pourra sans doute donner naissance à de nouvelles stratégies de sélection pour la résistance vis-à-vis des virus des mosaïques de l'orge. La très grande majorité des géniteurs de résistance est, en effet, composée de génotypes peu adaptés aux conditions de culture de l'Europe de l'Ouest. Ce sont des variétés locales ou des variétés asiatiques de type printemps, très sensibles au froid, à la verse et aux maladies (en particulier *Rhynchosporium secalis*). Le marquage de ces gènes de résistance devrait permettre d'accélérer leur introgression dans des génotypes adaptés aux conditions de culture de l'Europe.

La mise en évidence de nouveaux gènes (Graner *et al.*, 1995) indique une large diversité génétique pour la résistance au complexe viral de la mosaïque jaune de l'orge, mais également une spécificité vis-à-vis de ces différents virus ou souches virales. Les marqueurs moléculaires liés à ces gènes de résistance au complexe viral de la mosaïque jaune, offre l'opportunité de combiner efficacement ces gènes dans des variétés performantes sensibles à ces virus, par le déploiement pyramidal.

Sur base de la symptomatologie et du test Elisa effectué sur racines, nous avons identifié une descendance F₂ issue du croisement 'CF91.51' x 5607.042' pour laquelle la ségrégation pour la résistance au VJNO a été nettement observée. Nous avons réalisé une carte RFLP du chromosome 3 de l'orge à partir de cette descendance F₂, avec localisation du gène Yd2 par rapport à des marqueurs RFLP de référence. Sur les 33 sondes testées, 17 sont analysées pour la ségrégation, alors que les autres produisent soit des profils de bandes complexes soit sont monomorphes et ne sont donc pas cartographiées. La recherche de marqueurs RFLP, AFLP plus étroitement liés au gène Yd2 est en cours.

Bibliographie

1. ADAMS M.J., SWABY A.G., JONES P. (1987) Occurrence of two strains of barley yellow mosaic virus in England. *Plant Pathol* 36, 610-612.
2. ADAMS M.J., JONES P., SWABY A.G. (1988) The effect of cultivar used as host for *Polymyxa graminis* on the multiplication and transmission of barley yellow mosaic virus (BaYMV). *Ann. Appl. Biol.* 110, 321-327.
3. FRIEDT W., ORDON F., GÖTZ R. and KAISER R. (1990) Bodenbürtige Krankheiten, eine fortdauernde Herausforderung für die Pflanzenzüchtung-beleuchtet am Beispiel der Gelbmosaik-virose der Gerste. *Ber. Arbeitstag Saatzucht Gumpenstein* 40, 27-38.
4. FROIDMONT F., MAROQUIN C., STEYER S. (1993) La sélection d'orges résistantes à la mosaïque. *Parasitica* 49 (3-4), 107-114.
5. GRANER A., BAUER E. (1993) RFLP mapping of the ym4 virus resistance gene in barley. *Theor Appl Genet* 86, 689-693.
6. GRANER A., BAUER E., KELLERMANN A., PROESLER G., WENZEL G., ORDON F. (1995) RFLP analysis of resistance to the barley yellow mosaic virus complex. *Agronomie* 15, 475-479.
7. HARIRI D., FOUCHARD M., LAPIERRE H. (1990) Resistance to barley yellow mosaic virus and barley mild mosaic virus in barley. (Proc. 1st Symp. Intern. Working Group Plant Viruses with fungal vectors, Braunschweig, August 21-24, 1990, 109-112). *Phytoma - La Defense des végétaux* 429, Juin 1991.
8. HUTH W. (1991) Verbreitung der gelbmosaikviren, BaYMV, BaMMV and BaYMV-2 und Screening von Gerstensorten auf Resistenz gegenüber BaYMV-2. *Nachrichtenbl. Deutscher Pflanzenschutzdienst* 43, 233-237.
9. HUTH W., ADAMS M.J. (1990) Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV) and BaYMV-M : two different viruses. *Intervirology* 31, 38-42.
10. KAISER R., FRIEDT W. (1992) Gene for resistance to barley mild mosaic virus in German winter located in chromosome 3L. *Plant Breeding* 108, 169-172.
11. KASHIWAZAKI S., HAYANO Y., MINOBE Y., OMURA T., HIBINO H., TSUCHIZAKI T. (1989) Nucleotide sequence of the capsid protein gene of barley yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 70, 3015-3023.
12. KOSAMBI D.D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12, 172-175.
13. KUMMERT J. (1993) Viroses transmises par *Polymyxa*. Le diagnostic des agents viraux : techniques immunologiques et hybridation moléculaire. I: Diagnostic et caractérisation des agents de la mosaïque jaune de l'orge par le test sérologique ELISA. *Parasitica* 49 : 69-87.
14. LAING K.G., COUTTS R.H.A. (1988) The occurrence of two strains of barley yellow mosaic virus in England. *Neth. J. Pl. Path.* 94, 221-224.
15. LANDER E.S., GREEN P.G., ABRAHAMSON J., BARLOW A., DALY M.J., LINCOLN S.E., NEWBURG L. (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for construction primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1, 174-181.
16. QUALSET C.O. (1984) Evaluation and breeding methods for barley yellow dwarf resistance, 72-80. In : Barley yellow dwarf, a proceedings of the workshop. P. A. Burnett ed. CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico. 209 pp.
17. SCHALLER C.W., QUALSET C.O., RUTGER J.N. (1964) Inheritance and linkage of the Yd2 gene conditioning resistance to the barley yellow dwarf virus disease in barley. *Crop Sci.* 4, 544-548.
18. STEYER S., FROIDMONT F., KUMMERT J. (1995) Characterization of a resistance-breaking BaYMV isolate from Belgium. *Agronomie* 15, 433-438.

D4 : Étude de la variabilité d'*Helianthus annuus* sauvages

SERIEYS H., QUILLET M.C., KAAAN F., BERVILLÉ A.

INRA, Unité de Recherches 380, Génétique et Amélioration des Plantes, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France. Correspondance F.Kaan : téléphone 33 4 99 61 22 33, fax 33 4 67 54 04 15. Courrier électronique kaan@ensam.inra.fr

INTRODUCTION

Le genre *Helianthus* compte 49 espèces toutes originaires d'Amérique du nord (Schilling et Heiser, 1981). Il contient 4 sections : Chaque section contient des espèces dites diploïdes ($2n=34$) dont l'origine amphiploïde est en cours de validation (Sossey-Alaoui *et al.* 1994).

Section Ciliares : 6 espèces pérennes de petit développement originaires de l'Ouest de l'Amérique du Nord (génomés CC).

Section Atrorubentes : 31 Espèces pérennes originaires de toute l'Amérique du Nord dont *Helianthus tuberosus*, le topinambour hexaploïde (génomés CD).

Section Agrestes : 1 espèce annuelle isolée.

Section *Helianthus* : 11 espèces annuelles de toute l'Amérique du Nord (génomés CH) dont *Helianthus annuus* sauvage et sa forme cultivée *Helianthus annuus macrocarpus*, le tournesol.

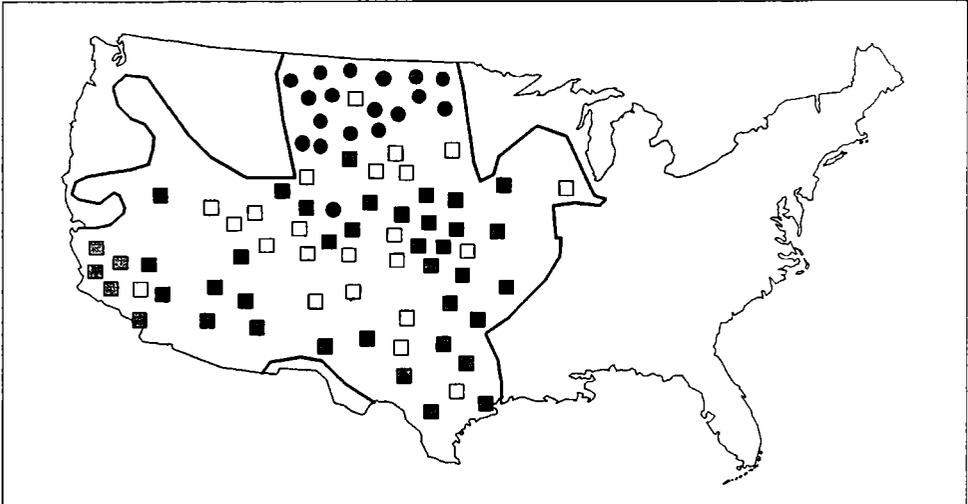
Les formes sauvages de l'espèce *H. annuus* sont originaires de l'Ouest de l'Amérique du Nord (États-Unis, Mexique, Canada) (figure 1). Comparées aux formes domestiques, les formes sauvages sont caractérisées par une forte ramification, les plantes portent de nombreux petits capitules de diamètre inférieur à 10 cm, les semences sont petites (poids de 1000 grains inférieur à 10 g). Physiologiquement, la différence la plus marquante entre sauvages et cultivés réside dans la germination. Les semences d'*H. annuus* sauvages sont dures et ne germent qu'après scarification et traitement hormonal. La biologie florale est caractérisée par l'entomophilie et une autostérilité presque complète, confirmée dans notre étude.

Les espèces annuelles d'*Helianthus* sont sympatriques des *H. annuus* sauvages d'Amérique du Nord. Des hybridations et introgressions sont probablement fréquentes. Elles ont pu donner naissance à des espèces hybrides telles *H. anomalus* (Rieseberg *et al.*, 1995).

Les conditions et le ou les lieux de domestication restent hypothétiques. Heiser (1985) a suggéré que *H.annuus* sauvage a été utilisé par les premiers américains comme aliment, puis est devenu une plante qui accompagnait l'homme dans ses campements, et a été ainsi introduite de l'Ouest vers la partie centrale des États-Unis. La dormance des semences permet également à ces formes adaptées à la cueillette d'avoir précédé les premiers Américains dans leurs campements au retour de leurs déplacements. La domestication proprement dite aurait eu lieu au centre des Etats Unis. De nombreuses formes d'*H. annuus* ont été trouvées dans des sites archéologiques datant de 4000-5000 ans (Asch and Asch, 1985; Watson, 1985). Ces formes se rencontrent dans le centre et l'Est des États-Unis alors que seuls des types sauvages ont été trouvés dans les sites du Sud-Ouest des États-Unis et au Mexique. L'objectif de l'étude que nous

présentons est d'acquérir quelques informations sur la structuration de la variabilité des populations sauvages, pour une valorisation à court et moyen terme, mais aussi et surtout pour mieux la gérer en orientant les prospections à venir, enfin pour disposer d'éléments pour entreprendre l'étude et l'évaluation d'éventuelles introgressions d'espèces voisines.

Figure 1. Distribution de l'espèce *H. Annuus* sauvage et localisation des écotypes étudiés dans ce travail.



Peu d'études sur la variabilité des *H. annuus* sauvages ont été réalisées (Seiler, 1984). Par contre, la variabilité génétique de ces populations a déjà été utilisée, d'abord pour rechercher des facteurs de restauration de la stérilité mâle cytoplasmique PET-1 de *H. petiolaris* par P. Leclercq (1969). Ces facteurs ont été largement utilisés dans le matériel restaurateur utilisé en sélection. Des facteurs de résistance au mildiou (*Plasmopara halstedii*) (Fick *et al.*, 1975) ont également été trouvés à plusieurs reprises et permettraient de faire face à l'ensemble des races de mildiou actuellement présentes. La ramification apicale récessive de la plupart des lignées restauratrices permet un bon échelonnement de la pollinisation au cours de la production de semences hybrides. Elle trouve son origine chez les types sauvages. La grande vigueur et le fort enracinement de nombreuses populations d'*H. annuus* sauvage sont probablement à l'origine d'un progrès génétique en aptitude à la combinaison et en tolérance au stress hydrique des composants d'hybrides actuellement cultivés, tels RHA 274 (Fick *et al.*, 1975) et HA 335. Certains caractères trouvés chez *H. annuus* sauvages pourraient faire l'objet d'une exploitation en sélection. Quatre types de stérilité mâle cytoplasmique à déterminisme génétique différent ont été trouvés dans des écotypes sauvages (Serieys, 1994), ainsi que plusieurs gènes de résistance à la rouille (*Puccinia Helianthi*) (Quresh *et al.*, 1993).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Quatre-vingt-une populations représentant un bon échantillonnage de l'aire de répartition de l'espèce (figure 1) ont été étudiées.

Elles proviennent de prospections anciennes et de 2 prospections récentes : MPHE 383, 386, 519, 654, Arizona ; 646, Arkansas ; 410, 421, 435, 437, 446, 458, 468, 833, California ; 363, 660, 980, 989, 996, 1147, 1148, Colorado ; 211, Illinois ; 665, 829,

Iowa ; 733, 997, 998, 999, 1000, 1007, 1011, Kansas ; 351, Missouri ; 943, 945, 948, 954, 1150, Montana ; 1012, 1016, 1018, 1023, 1030, Nebraska ; 775, Nevada ; 461, 463, 649, 661, 928, 929, 931, 933, 939, 1151, North Dakota ; 651, 662, Oklahoma ; 378, 388, 970, 1042, 1047, 1055, 1136, South Dakota ; 209, 509, 511, 647, 648, 650, 652, 734, Texas ; 658, 774, 822, 826, 1149, Utah ; 358, 361, 955, 963, 966, 974, 975, Wyoming.

Elles ont également été choisies sur la base d'évaluations anciennes pour des contrastes sur les caractères de croissance, de développement des différents organes, et de qualité (teneur en huile).

Cinq plantes de chaque population ont été étudiées au champ en 1996. L'autostérilité a été vérifiée par ensachage de toutes les plantes. Toutes les populations ont été croisées avec succès avec 3 lignées de tournesol cultivé.

Les caractères mesurés sont :

- Des caractères de croissance et de développement des organes mesurés de manière quantitative :

- latitude et longitude de prospection ;
- hauteur de plante ;
- longueur du plus long axe latéral ;
- longueur maximale du limbe et du pétiole de la feuille ;
- intensité de ramification basale ;
- intensité de ramification médiane ;
- intensité de ramification apicale ;
- date d'anthèse ;
- diamètre des capitules ;
- longueur d'akène ;
- largeur d'akène ;
- poids de 1000 grains ;
- teneur en huile.

- Le deuxième type de caractères est constitué par des caractères de forme et de couleur notés de manière qualitative :

- forme des feuilles 6 classes; anthocyane feuille 4 classes; denture feuille (3 classes) ; section de la feuille (2 classes) ; ondulation des feuilles (3 classes) ;
- port du Capitule (4 classes) ; anthocyane de la fleur (3 classes) ;
- présence ou absence de stérilité mâle ;
- couleur de fond de l'akène (7 classes) ; striure akène (absence ou présence) ;
- moucheture de l'akène (absence ou présence) ;
- largeur de la bractée (8 classes) ; longueur de la bractée (2 classes) ; forme de la bractée (2 classes) ; pic des bractées (5 classes).

RÉSULTATS

Le polymorphisme intra et interpopulation est très important ; Par exemple, la taille de plante peut varier de 1 à 4 mètres. Les résultats ont été regroupés par échantillon de chaque population.

Pour les caractères de croissance et de développement, ainsi que de dimension et teneur en huile des akènes, nous avons fait une analyse en composantes principales en considérant que ces caractères présentaient une variation continue. une forte structuration se dégage de cette analyse. 60 % de la variation est décrit par 2 axes principaux (**Figure 2**). Le premier est lié à une taille élevée, une anthèse tardive, une latitude basse : c'est un axe lié à la longueur du cycle de croissance et de

développement en relation avec la latitude, ou plus simplement un axe de précocité. le second axe est corrélé à une faible ramification basale médiane et apicale, un fort diamètre de capitule, un poids de 1000 grains élevé. C'est donc un axe lié aux forces de domestication.

L'analyse des caractères de forme et de couleur a été réalisée sur la moyenne des individus de chaque population, en considérant la variation comme discontinue, chaque population appartenant ou non à une classe déterminée. Cette mise en forme des résultats permet une analyse qualitative l'analyse factorielle de correspondances. Les résultats montrent une faible structuration. Les 4 premiers axes ne rendent compte que de 30 % de la variation (**figure 3 et 4**). L'examen des nuages de points fait apparaître des distributions très condensée, avec quelques hors types qui se différencient souvent pour des caractères très spécifiques et se rapprochent parfois du phénotype d autres espèces sauvages.

Figure 2. Analyse en composantes principales pour les caractères quantitatifs. Répartition des écotypes selon les 2 axes majeurs. Chaque point est représenté par l'abréviation de l'état ou la prospection a été réalisée.

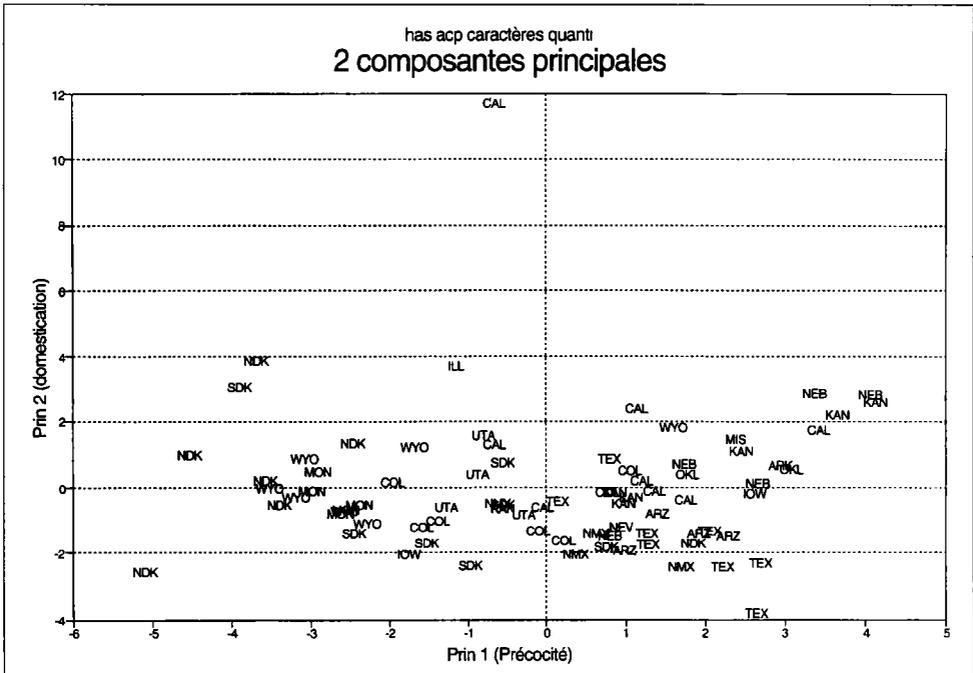


Figure 3. Analyse factorielle des correspondances pour les caractères qualitatifs. Représentation des 2 premiers axes. Chaque point est représenté par le numéro d'introduction de l'INRA Montpellier.

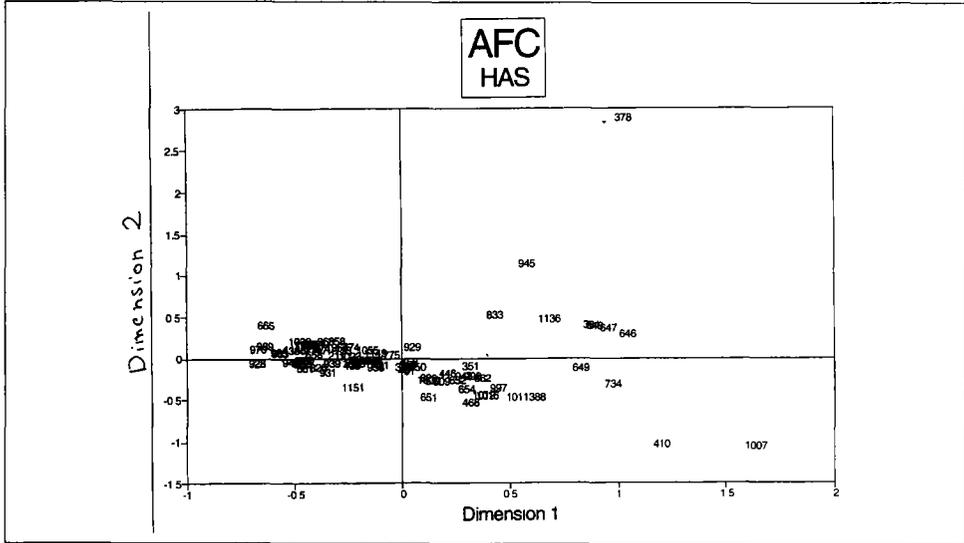
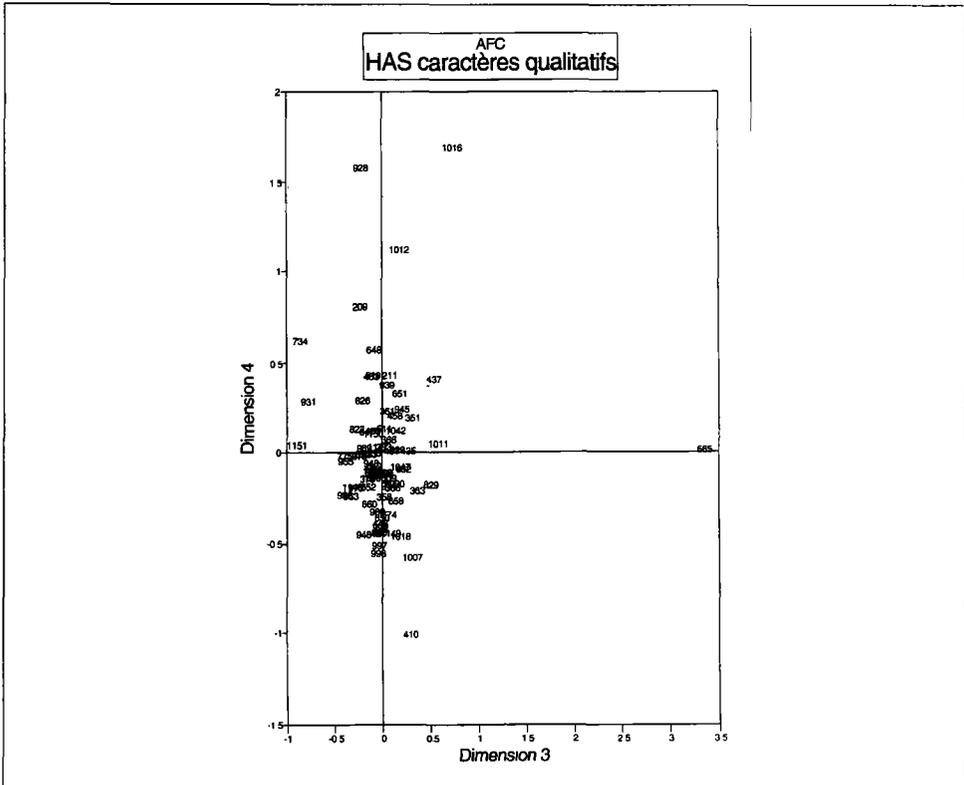


Figure 4. Analyse factorielle des correspondances pour les caractères qualitatifs. Représentation des 3^e et 4^e axes.



DISCUSSION

L'interprétation des résultats de la variation de croissance et de développement quantitative des organes, est *a priori* plus soumise aux facteurs de sélection que la variation qualitative de forme et de couleur. Les caractères quantitatifs sont de fait dans cette étude beaucoup mieux structurés en relation avec les forces de sélection liées à la durée du cycle (latitude) d'une part, et les forces de domestication d'autre part. Cependant, l'effet des forces de domestication est ambigu dans la mesure où des flux de gènes ont pu intervenir dans les 2 sens entre compartiments sauvages et cultivés pour façonner la variabilité étudiée. Des types intermédiaires issus d'une pré-domestication de plantes qui accompagnaient les premiers américains et étaient utilisées en cueillette peuvent également avoir contribué à façonner la variabilité des populations que nous avons reçues et qui seraient dans cette hypothèse redevenues sauvages ou adventices.

La faible structuration de la variabilité pour les caractères qualitatifs peut également s'expliquer en partie par les migrations ou le nomadisme des premiers américains qui auraient utilisé cette espèce. Les hors types peuvent être associés à des introgressions sans doute fréquentes en raison de la sympatrie avec d'autres espèces annuelles qui se croisent facilement avec *H. annuus*. La constitution cytogénétique de ces espèces est cependant bien différente de celle d'*H. annuus*. Par exemple, l'espèce *H. argophyllus* considérée comme la plus proche d'*H. annuus* présente au moins 2 translocations qui l'en distinguent (Quillet et al. 1995). Un fort déficit de viabilité pollinique est observé chez les hybrides interspécifiques. Les résultats préliminaires de l'examen d'hybrides entre toutes les populations étudiées et 3 testeurs lignées indiquent de fait une viabilité pollinique inférieure chez un grand nombre d'individus.

Ce déficit ne doit pas être confondu avec les très nettes ségrégations d'individus complètement mâles stériles observées dans notre étude sur 5 populations et liées dans tous les cas déjà étudiés à une interaction génocytosplasmique. Ces interactions ont été décrites chez des hybrides interspécifiques (Leclercq, 1969), mais également chez 4 écotypes d'*H. annuus* sauvages. Ces sources de stérilité mâle cytoplasmiques dénommées ANN-1 à ANN-4 sont clairement différenciées par la génétique de leur restauration (Serieys, 1994). Elles peuvent représenter une alternative à l'utilisation industrielle exclusive de la source PET-1 de P. Leclercq.

Un réservoir de variabilité considérable, peu ou mal exploité, mais encore disponible par prospection existe donc chez cette espèce sauvage. L'orientation de prospections futures peut valoriser la diversité de ces ressources *in situ*, en tenant compte des éléments de structuration qui apparaissent dans cette étude : précocité et domestication pour certains caractères, introgression avec des espèces sympatriques dont la répartition est relativement bien connue (Schilling et Heiser, 1981.) par ailleurs. Les progrès génétiques à en attendre concernent l'aptitude générale et spécifique à la combinaison, l'adaptation au stress hydrique, la résistance aux maladies.

Bibliographie

1. ASCH and ASCH, 1985 149-204 in Prehistoric food production in North America. Anthrop. Paper 75. Museum of Anthropology, Univ. Of Michigan, Ann Arbor.
2. FICK G.N., KINMAN M.L., ZIMMER D.E., 1975. Crop Sci. 15 106.

3. HEISER (1985) 57-72 in Prehistoric food production in North America. Anthropol. Paper 75. Museum of Anthropology, Univ. Of Michigan, Ann Arbor.
4. LECLERCQ (1969). Ann. Amél. Pl. 19 99-106.
5. QUILLET, MADJIDIAN, GRIVEAU, SERIEYS, TERSAC, LORIEUX, BERVILLÉ. 1995 6
6. QURESH JAN GULYA., 1993 Plant Breeding 110 297-306.
7. RIESEBERG, VAN FOSSEN, DESROCHERS., 1995 Nature 375 313-316.
8. SCHILLING, HEISER, 1981 Taxon 30 393-403.
9. SEILER, 1984 Helia 7 29-33.
10. SERIEYS, 1994 Helia 17(21) 94-102.
11. SOSSEY-ALAQUI, SERIEYS, TERSAC, LAMBERT, BERVILLÉ 1994. 9-21. in : *The Royal Botanic Gardens, Kew. Caligari, P.D.S. and Hind, D.J.N. editors. Compositae: Biology and Utilization. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994.* (D.J.N. Hind, editor-in Chief).
12. WATSON, 1985 99-148 in Prehistoric food production in North America. Anthropol. Paper 75. Museum of Anthropology, Univ. Of Michigan, Ann Arbor.

D5 : L'arganier : un candidat à la domestication

BANI-AAMEUR F.

Laboratoire de Recherche sur la Variabilité Génétique, Université Ibnou Zohr, Faculté des Sciences, B.P. 28/s, 80 000 Agadir, Maroc

Argania spinosa L. Skeels est l'unique espèce du genre *Argania*, famille des sapotacées (Baehni, 1948 ; Ehrig, 1974). Cet arbre forestier endémique poussant sur 830 000 ha au Maroc, semble être un reliquat de l'ère tertiaire. L'arganier a une valeur écologique indéniable étant très résistant aux conditions arides. Traditionnellement, il est producteur d'huile (Ehrig, 1974 ; Fairchild, 1930 ; Jaccard, 1926 ; Chimi et al., 1994), de fourrage (Fellat-Zarrouk et al., 1987) et de bois (M'hirit, 1989). Sa valeur potentielle est actuellement à la hausse parce que de nouveaux usages sont apparus. La demande pour l'huile est en augmentation pour de usages diététiques du fait qu'elle renferme jusqu'à 80 % d'acide gras insaturés (Ksir et al 1995). Ses composants insaponifiables sont intéressants pour l'industrie des cosmétiques (Boukhoubza and Pichon Prum 1988). Les saponines du bois et du tourteau, résultat de l'extraction de l'huile, ont des usages médicaux (Alaoui et al 1995). Les stérols triterpéniques (Farines et al. 1981) et les flavinoïdes des feuilles et de la pulpe du fruit, qui renferme aussi de la gutta percha, peuvent présenter des intérêts pour différentes industries (Sandret, 1957 ; Fellat-Zarrouk et al. 1987).

Actuellement l'arganier est un arbre forestier endémique à l'état sauvage situé au Sud-Ouest du Maroc. Il est soumis à des prélèvements irrationnels et abusifs de rameaux, de feuilles, de bois et de fruits qui détruisent les arbres et ne laissent aucune chance à la régénération naturelle. L'aridité du milieu et la difficulté de produire des plants forment une barrière au rétablissement de l'arganier par reboisement. Donc, bien que sa longévité et sa résistance à l'aridité de son milieu soient phénoménales, il reste menacé de déperdition.

Le recensement et la caractérisation des réserves naturelles de l'arganier, selon des critères botaniques, génétiques, écologiques, géographiques et économiques est un impératif pour l'élaboration d'une stratégie globale de la protection des sites géographiques bien déterminés, et pour leurs reboisements à partir des arbres « plus ». La propagation de ces arbres sélectionnés permettrait de conserver la diversité existante, et d'améliorer le niveau de vie des populations riveraines en améliorant la productivité des arbres exploités dans un cadre de développement durable. Cette conservation serait d'autant plus efficace qu'elle s'établirait à partir de matériel végétal bien identifié. Par la même occasion, l'installation de parcelles expérimentales à partir des descendants d'arbres « plus » serait un premier pas vers la création de vergers de pieds-mères semenciers de l'arganier.

Notre recherche s'est d'abord attelée à décrire l'arganier pour constituer une gamme de descripteurs permettant de décrire la variabilité phénotypique et génétique disponible. Cette gamme de caractères couvre aussi bien les caractères morphologiques que les caractères d'intérêt économique. L'approche adoptée permet de caractériser le potentiel écologique et physiologique, de déterminer les mécanismes d'adaptation de l'espèce à son environnement, le potentiel producteur en terme de biomasse et de fruits, et la caractérisation moléculaire pour pouvoir marquer les génotypes les plus intéressants, et les propager. Les résultats de nos recherches en biotechnologie ont des applications potentielles par l'aménagiste de la forêt aussi bien

pour le reboisement par l'arganier à court terme à partir de provenances des régions délimitées, à moyen terme à partir de populations améliorées, et à long terme par sa domestication éventuelle en tant qu'arbre oléicole.

CONDITION DE PRODUCTIVITÉ

Trois populations identifiées dans trois localités géographiques écologiquement distinctes, Ait Melloul (AM), Argana (AR) et Ait Baha (AB) sont l'objet de nos observations depuis 1989 (Ferradous et al., sous presse). Tous les arbres ne fleurissent pas et ne fructifient pas sous les mêmes conditions (Ferradous 1995). Certains résistent mieux à la sécheresse que d'autres. Dans ce contexte Ait Baha, la station la plus aride, se remarque comme la station pilote pour tester la résistance des arganiers au stress hydrique d'une part, et comme une provenance privilégiée du matériel destiné au reboisement et à la lutte contre la désertification.

Globalement, il suffit de 100 mm de pluie en automne pour que tous les arbres fleurissent et fructifient et que les fruits atteignent un poids optimal (Ferradous et al., sous presse). Tous les rameaux fleurissent, mais seules les branches maîtresses et les rameaux de plus de deux années d'âge fructifient, la deuxième catégorie étant privilégiée en période de sécheresse (Zahidi et Bani-Aameur 1996 b). Considérant l'évolution du poids du fruit, de la pulpe, de la coque et des amandes, Ait Melloul, la station la plus océanique, est la plus précoce suivie par Argana et par Ait Baha (Belmouden et Bani-Aameur 1996 b).

Les rendements des arbres sous des conditions raisonnables varient de 1 à 24 kg de fruits desséchés (Bani-Aameur et al. in review b). Si on ignore les autres composantes du fruit dont l'intérêt n'est pourtant pas négligeable, ces rendements correspondent à un rendement de 0,05 à 1,2 Kg d'amandes (Belmouden et Bani-Aameur 1996 b) ou encore 0,03 à 0,6 Kg d'huile. Avec le peuplement actuel de 40 arbres à l'hectare, le rendement en huile n'est que de 24 litres d'huile dans le meilleur des cas. En réalité, il est beaucoup moins que 24 litres. Considérons maintenant la perspective plus optimiste de l'exploitation d'un clone sélectionné planté à 200 arbres à l'hectare (densité classique d'une plantation d'agrumes). Même en supposant qu'on ne puisse pas dépasser les 24 kg par arbre, ce qui est peu probable, le rendement à l'hectare serait de 4 800 Kg et le rendement en huile serait de 120 litres.

L'arganier associe un intérêt écologique indéniable pour les zones arides, à une valeur économique actuelle et potentielle qui n'est plus à démontrer. L'étude de la ramification de la floraison et de la fructification que nous poursuivons permettrait d'établir les bases scientifiques pour des techniques de taille sylvicole et fruitière. Celles ci permettront d'accroître la production fruitière tout en fournissant aux utilisateurs un bois d'œuvre ou de chauffage dont le prélèvement incontrôlé jusqu'à présent menace la forêt de disparition surtout en zone montagnaise.

MISE AU POINT DES DESCRIPTEURS

Caractérisation du fruit et du noyau

Six formes de fruit (fusiforme, ovale, ovale apiculée, goutte, arrondie et globuleuses) et trois formes de noyau (fusiforme, ovale et arrondie) ont été décrites (Bani-Aameur et al, 1997 ; Bani-Aameur et al., a, in review). La forme ovale du fruit est la plus fréquente (40 % environ), la forme goutte est la plus rare (2,5 %). La forme ovale du noyau est la plus fréquente (55 %) et la forme fusiforme est la plus rare (16 %).

La composante génétique de 11 caractères morphologiques mesurables du fruit et du noyau était remarquable dans la mesure où plus de 40 % de ces caractères avaient une forte héritabilité.

Après hiérarchisation, il s'est avéré que les caractères les plus discriminants entre les arbres sont le poids du fruit et sa longueur, le poids du noyau et sa longueur (Ferradou, 1995). À partir de ces données, la dispersion des types morphologiques entre les stations d'étude s'était avérée chevauchante. Ainsi pour les caractères mentionnés ci-dessus du fruit et du noyau, les populations d'arganier ne correspondent pas à des écotypes adaptés à des niches écologiques définies, mais à une population d'individus similaires dispersés entre les stations étudiées. Ce résultat est un premier jalon dans la réflexion à entamer sur le modèle de conservation *in situ*. A priori, une seule population suffisamment large suffirait au lieu de plusieurs populations comme ça aurait été le cas s'il s'agissait de plusieurs écotypes, mais ces conclusions restent à préciser en tenant compte d'autres caractères, notamment les caractères adaptatifs.

La floraison

Quatre phases phénologiques de la fleur sont déterminées : (le bouton floral de 1 à 2 mm, le bouton floral avec le style apparent de 2 à 3,15 mm, la fleur épanouie de 2 et 3,15 mm et le fruit noué de 2 mm (Louali et al., 1994 ; Louali, 1994, Louali et al 1995). L'anthèse a lieu au stade bouton floral dès que le style commence à pointer (Belmouden et al. 1995). Le pollen présente entre deux et six pores, son diamètre variant entre 17 et 33 μm (Belmouden et Bani-Aameur 1996). Il reste viable après une conservation au froid de six mois (Belmouden et Bani-Aameur 1995). Les études de la fleur et du pollen permettent d'élucider la mode de reproduction de l'arganier, qui reste encore méconnu, et sur lequel nous continuons les recherches. D'autre part, ces études préparent la pollinisation artificielle en vue de la réalisation des croisements dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique.

Étude de la feuille

Il y a deux types de feuilles chez l'arganier, les feuilles simples portées par les rameaux jeunes et les feuilles groupées portées par les rameaux âgés (Zahidi et al. 1994, Zahidi 1994, Zahidi et al 1995). La position de la feuille sur le rameau est une source de variation des dimensions (Zahidi et Bani-Aameur 1996 a, Zahidi et Bani-Aameur in review a). La longueur de la feuille au même titre que le produit de la longueur par la largeur, était un indicateur efficace de l'importance de la surface foliaire. Quatre types morphologiques de feuilles ont été recensés dans les populations étudiées (obovale, lancéolée à sommet mucroné, lancéolée à sommet aigu, et spatulée) (Bani -Aameur et al 1997c).

Architecture de l'arbre et de la plantule

Cinq types morphologiques d'arbres sont caractérisés par rapport à la ramification et à la présence des épines. Contrairement à l'idée véhiculée jusqu'à présent de l'existence de deux types, le type dressé épineux et le type pleureur inerme, on a pu distinguer le type I très épineux et très ramifié (10 %), le type II épineux ramifié (16,7 %), le type III épineux peu ramifié (31,1%) ; le type IV moins épineux peu ramifié (23,3 %), et le type V inerme peu ramifié (18,8 %) (Zahidi et al 1995).

La domestication de l'arganier en tant qu'arbre fruitier oléicole, passe par la production de plants accessibles aux techniques culturales telles que la taille et la récolte. Ces techniques seraient plus aisées avec des plants raisonnablement ramifiés et peu épineux. La variabilité génétique inter et intra-familiale de 20 caractères de la

ramification de la tige et de la racine des plantules âgées d'un an élevées en pépinière était remarquable (Zahidi et Bani-Aameur 1997 b et c). Les moyennes des hauteurs des tiges variaient entre 69,3 et 6,5 cm, et les longueurs des racines entre 138,4 et 10,7 cm. Toutes les tiges n'étaient pas ramifiées. Les héritabilités au sens stricte du nombre de feuilles simples étaient les plus élevées (0,65). La plus faible héritabilité (0,06) était observée pour le nombre de rameaux secondaires. Les héritabilités de la longueur de la tige, la longueur de la racine et de leur rapport sont respectivement de 0,38, 0,25 et 0,31.

PHÉNOLOGIE

L'évolution de la phénologie de l'arganier en fonction des changements climatiques est importante à connaître pour l'établissement des techniques d'exploitation de la forêt. Ainsi le cycle fleur-fruit dure entre 9 et 16 mois selon les génotypes et les conditions du milieu (Bani-Aameur et al. in review b). Pour les feuilles, une distinction s'est faite entre les feuilles simples et les feuilles groupées (Ferradous et al. sous presse, Zahidi et al., 1994, Zahidi 1994, Zahidi et al., 1995). Les premières qui n'apparaissent que sur les rameaux de l'année sont persistantes dans une grande proportion. Elles ne tombent que sous l'effet d'une sécheresse prolongée, quand l'arbre se dégarnit complètement. Les feuilles groupées sont par contre caduques. Cependant l'intensité des phénomènes décrits varie énormément d'un arbre à un autre. Ainsi, la phénologie de la feuille, élément essentiel de la biomasse de l'arbre est aussi un indicateur de la réaction de l'arbre au stress hydrique (Zahidi et Bani-Aameur 1996 a).

Nous continuons ces études en intégrant l'apparition et la croissance des rameaux et des feuilles en liaison avec l'architecture de l'arbre. Notre objectif est de proposer un système d'exploitation sylvicole propre à l'espèce dans les conditions arides de son milieu. L'arganier évite les fortes températures et les longues sécheresses en rentrant en repos (Ferradous et al. sous presse). Il perd progressivement feuilles, fleurs et fruits au fur et à mesure que les conditions du milieu se détériorent. Après une sécheresse prolongée, la production de la biomasse est presque nulle.

MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'ÉLEVAGE DES PLANTULES

La régénération naturelle ou artificielle de l'arganier est pratiquement absente. L'échec ainsi constaté a été expliqué par la difficulté de l'établissement des plantules après transplantation soit par l'aridité du milieu soit par l'attaque de prédateurs. Dans le passé, il n'a jamais été lié - à notre connaissance - aux attaques des plantules par les agents pathogènes. Récemment nous avons identifié certains agents pathogènes responsables de la fonte de semis en pré-émergence et en post-émergence dont le plus important est le *Fusarium oxysporum* (Zahidi et Bani-Aameur 1996c, d, 1997 a, sous presse). La température, les conditions de stockage et le génotype pour le premier type de fonte de semis ; le génotype et le micro-climat pour le deuxième type, sont des facteurs hautement significatifs. Nous avons eu aussi l'occasion de constater que les modalités de conservation ainsi que les conditions de germination et d'élevage des plantules ne sont pas encore au point. Ainsi nous avons pu démontrer que vu les sensibilités différentielles des génotypes aux pathogènes, le risque existe d'établir un fort gradient de sélection à effet réducteur sur le pool génétique de l'arganier.

UTILISATION DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES

Nous avons opté pour l'utilisation de la méthode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) pour l'amplification de l'ADN comme source de marqueurs génétiques pour estimer la diversité génétique de l'arganier, et pour caractériser les sources de germplasm. Nous avons mis au point la méthode d'isolement de l'ADN (Bani-Aameur et Hilu 1995, 1996). La méthode RAPD a été testée sur un échantillon d'arbre avec succès. Elle est actuellement en cours d'exploitation pour étudier la diversité génétique des marqueurs moléculaires de l'arganier grande échelle dans l'aire de dispersion de l'arganier.

PERSPECTIVES

L'arganier lance un défi à la biotechnologie. Pour le relever, nous avons d'abord œuvré et nous continuons à construire une base de données biologiques et écologiques, notamment par une prospection de la variabilité phénotypique, et par une étude de la diversité génétique couvrant l'étendue de l'aire de répartition de l'espèce. Dès le départ, il s'est avéré qu'il faut avoir une meilleure connaissance du comportement de cette essence forestière xérophyte et thermophile sous climat aride pour exploiter au mieux son potentiel d'arbre forestier et fruitier oléicole, en le valorisant et en le protégeant. Ainsi, il peut servir de modèle d'étude pour de nombreuses espèces d'arbres et arbustes des zones arides et semi-arides, et développer des synthèses méthodologiques pour assurer un transfert efficace des connaissances. L'étape actuelle consiste à mettre en marche les recherches en biotechnologie pour valoriser cette espèce.

Bibliographie

1. ALAOUI K., ABIDA A., BOUROUD H., CHARROUF Y.Z., HASSAR M., AMAROUCHE H., ROQUEBERT J. 1995. Activités pharmacologiques des saponines. Colloque International. La Forêt Face à la Désertification : Cas des arganeraies. Faculté des Sciences d'Agadir 26- 28 Oct. 1995 p. 61.
2. BAEHNI C. 1948. Mémoires sur les Sapotacées. 1. Système de classification. *Candolea* 7 394-476.
3. BANI-AAMEUR F. 1994. Variabilité génétique du fruit et de la graine de l'arganier. Deuxièmes journées de l'arbre : Marrakech le 20-21 Avril 1994. (Abstract).
4. BANI-AAMEUR F., HILU K.W., 1995. Amplification de l'ADN de l'arganier par la méthode RAPD. Colloque international : La forêt face à la désertification. cas des Arganeraies. Agadir, Maroc. 26, 27, et 28 octobre 1995.
5. BANI-AAMEUR F., HILU K.W., 1996. Use of DNA from Argan leaves for RAPD analysis. Conference on Plant Taxonomy, Barcelone 19-22 September 1997. (Abstract) p 89.
6. BANI-AAMEUR F., FERRADOUS A., DUPUIS P., in review, a. Typology of *Argania spinosa* (Sapotaceae) fruits and stones. *Am. J. Bot.*
7. BANI-AAMEUR F., LOUALI L., DUPUIS P., in review, b. Maturation et chute des fruits de l'arganier. *Actes Inst Agron. Vét. (Maroc)*.
8. BANI-AAMEUR F., FERRADOUS A., ZAHIDI A., LOUALI L., BELMOUDEN S., DUPUIS P. (1997) Typology studies of *Argania spinosa* (Sapotaceae). 13th Symposium Morphology, Anatomy and Systematics, Leuven 6- 11 avril 1997.
9. BANI-AAMEUR F., 1997. Diversité, phénologie, régénération et conservation de l'arganier. Séminaire sur l'amélioration, la conservation et l'utilisation des ressources génétiques forestières marocaines. 8-10 Mai, ENFI, Salé.

10. BELMOUDEN S., BANI-AAMEUR F., 1995. Contribution à l'étude de l'anthèse et à la viabilité du grain de pollen. Colloque international : La forêt face à la désertification.: cas des arganeraies. Agadir, Maroc. 26, 27, et 28 octobre 1995 (Poster).
11. BELMOUDEN S., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P., 1995. Distribution de glomérules fructifères selon le type de rameaux de l'arganier. Colloque international : La forêt face à la désertification.: cas des arganeraies. Agadir, Maroc. 26, 27, et 28 octobre 1995 (Poster).
12. BELMOUDEN S., BANI-AAMEUR F. 1996 a. Dimension, nombre de pores et viabilité du pollen de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels). Premières Rencontres Nationales des étudiants chercheurs en Biologie. Marrakech 17-19 décembre 1996.
13. BELMOUDEN S., BANI-AAMEUR F. 1996 b. Évolution du poids du fruit de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels). Premières Rencontres Nationales des étudiants chercheurs en Biologie. Marrakech 17-19 Décembre 1996.
14. BOUKHOUBZA M., PICHON PRUM N . 1988. L'arganier ressource économique et médicinale pour le Maroc. *Phytoterapy* 27: 21-26.
15. CHIMI H., CILLARD J., CILLARD P. 1994. Autooxydation de l'huile d'argan *Argania spinosa* L. du Maroc. *Science des aliments* 14: 117-124.
16. EHRIG F.R. 1974. Die arganie charakter, okologie und wirtschaftliche Bedeutung eines tertiarerliktes in Morokko. *Ptermanns geographische Mitteilungen* 118 (2):117-125.
17. FAIRCHILD D. 1930. *Exploring For Plants*. Mc Millan Company. N.Y. : 168-185.
18. FARINES M., CHARROUF M., SOULIER J. 1981. The sterols of *Argania spinosa* seed oil. *Phytochemistry* 20: 2038-2039.
19. FELLAT-ZARROUK K., SMOUGHEN S., MAURIN R. 1987. Étude de la pulpe du fruit de l'arganier (*Argania spinosa*) du Maroc. *Matiere grasse et latex. Actes Inst. Agron. Vet.* 7: 17-21
20. FERRADOUS A., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1994. Diversité génétique de l'arganier : cas du fruit et de la graine. Séminaire National "Ressources Phytogénétiques et développement durable". IAV Hassan II, Rabat, du 24 au 26 octobre 1994.
21. FERRADOUS A., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1995. Phenologie et fructification de l'arganier. Colloque International : La Forêt Face à la Désertification : Cas des arganeraies. Faculté des Sciences d'Agadir. p. 32.
22. FERRADOUS A. 1995. Diversité génétique de quelques caractères du fruit et de la graine d' *Argania spinosa* (L.) Skeels. Thèse de Diplôme des études supérieures de 3^e cycle. Faculté des Sciences, Université Ibnou Zohr Agadir. 190p.
23. FERRADOUS A., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1996. Climat stationnel, phénologie et fructification de l'arganier *Argania spinosa* L. Skeels. Actes de l'Institut Agronomique et Vétérinaire (In press).
24. JACCARD, P. 1926. L'arganier sapotacée oléagineuse du Maroc. *Pharma. Acta. Helvetiae* 11: 203-209.
25. KSIR M., MAURIN R., FELLAT-ZARROUK K. 1995. De la structure des acides gras et des triglycrides de l'huile d'argan « *Argania spinosa* » du Maroc. Colloque International : La Forêt Face à la Désertification : cas des arganeraies. Faculté des Sciences d'Agadir. p. 105.
26. LOUALI L. BANF-AAMEUR F., DUPUIS P. 1994. Diversité génétique de l'Arganier : cas du système reproducteur. Séminaire National « Ressources Phytogénétique et développement durable ». IAVH2, Rabat, du 24 au 26 Octobre 1994.
27. LOUALI L., 1994. Variabilité de la floraison et de la fructification de l'arganier. Thèse de CEA Environnement. Faculté des Sciences, Université Ibnou Zohr Agadir. 80 p.
28. LOUALI L., BANF-AAMEUR F., DUPUIS P. 1995. Caractérisation et évolution des stades de floraison de l'arganier. Colloque international : La forêt face à la désertification : cas des arganeraies. Agadir, Maroc. 26, 27, et 28 octobre 1995.
29. LOUALI L., DUPUIS P., BANI-AAMEUR F. 1995. Évolution de la chute des fruits de l'arganier. Colloque international : La forêt face à la désertification : cas des arganeraies. Agadir, Maroc. 26, 27, et 28 octobre 1995.
30. M'HIRIT O. 1989. L'arganier, une espèce fruitière forestière à usage multiple. Formation Forestière Continue, thème « l'arganier », Station de Recherches Forestière, Agadir, 13-17 mars: 31-57.
31. SANDRET F. 1957. La pulpe d'argan : composition chimique et valeur fourragère, variation au cours de la maturation. *Annales de la Recherche Forestière* 4: 153-177.
32. ZAHIDI A., BANF-AAMEUR F., DUPUIS P. 1994. Diversité génétique de l'arganier : cas de la feuille. Séminaire National « Ressources Phytogénétiques et développement durable ». IAV Hassan II, Rabat, du 24 au 26 octobre 1994.
33. ZAHIDI A. 1994. Variabilité du rameau et de la feuille de l'arganier. Thèse de CEA Environnement. Faculté des Sciences, Université Ibnou Zohr Agadir. 80 p.

34. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F., DUPUIS P. 1995. Caractérisation de la ramification de l'arganier. Colloque International : La Forêt Face à la Désertification : cas des arganeraies. Faculté des Sciences d'Agadir. p. 32.
35. ZAHIDI A., FERRADOUS A., BANI-AAMEUR F. 1996. Morphological diversity of three Argan populations (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Conference on Plant Taxonomy, Barcelone 19-22 September 1997. (Abstract) p 82.
36. ZAHIDI A., FERRADOUS A., BANI-AAMEUR F. (in review). Morphological diversity of three Argan populations (*Argania spinosa* (L.) Skeels).
37. ZAHIDI A., F. BANI-AAMEUR 1996 a. Effet de la position sur les dimensions des feuilles des rameaux de l'arganier. Premières Rencontres Nationales des étudiants chercheurs en Biologie. Marrakech 17-19 December 1996.
38. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. 1996 b. La ramification fructifère de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) Premières Rencontres Nationales des étudiants chercheurs en Biologie. Marrakech 17-19 décembre 1996.
39. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. 1996 c. Conditions de germination et de survie des amandons d'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Premières Rencontres Nationales des étudiants chercheurs en Biologie. Marrakech 17-19 décembre 1996.
40. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. 1996. Germination et survie des amandes de l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) : effet de l'âge, de la date de semis et du génotype. Annales de la Recherche Forestière 30. In press.
41. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. (1997). Germination and seedlings survival of argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) : combined effects of environment and genotype. Rencontres Internationales Ressources génétiques des plantes en Afrique des Savanes. Bamako, 24 - 28 février 1997.
42. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. 1997. Variabilité génétique des caractères de la ramification des plantules d'arganier. Les sixièmes Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies-Génie Génétique des plantes de l'AUPELF.UREF. Centre Universitaire d'Orsay de l'Université Paris Sud XI. 30 juin-3 juillet 1997.
43. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. 1997. Argan genetic diversity of root and shoot characters. Botanical Society of America Annual Meetings, 3 - August, 1997, Palais des Congrès, Montréal, Québec.
44. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. (In review). Une méthode d'échantillonnage des feuilles d'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Annales de la Recherche Forestière du Maroc.
45. ZAHIDI A., BANI-AAMEUR F. (In review). Argan seedling dumping off : effects of genotype, age and kernel origin. Ecologia Mediterranea.

D6 : Structure génétique de l'arganier *Argania spinosa* L. Skeels

EL MOUSADIK A.

Université Ibnou Zohr, Faculté des Sciences, BP 28/S. Agadir

INTRODUCTION

L'arganier du Sud-Ouest marocain est une ressource génétique forestière endémique à vocation agro-sylvo-pastorale. Son rôle environnemental se manifeste clairement dans son ambiance aride et pré-saharienne où aucune essence n'a pu le remplacer à l'état spontané. Cependant, l'état actuel de la santé de l'arganier n'est plus satisfaisant devant son rythme de dégradation accompagné d'une absence quasi totale de sa régénération naturelle sous l'effet de pressions multiples et répétitives subies par les différents écosystèmes. Il en résulte une perte certaine de la diversité génétique existante, d'où la nécessité d'une politique visant la sauvegarde d'une façon rationnelle de la diversité génétique disponible. En effet, l'analyse et l'évaluation de la diversité génétique vient en amont avant tout aménagement forestier. Par ailleurs, notre but est de mettre au point une gamme de marqueurs utilisant le polymorphisme génétique afin de décrire comment l'arganier est structuré aux niveaux intra et interpopulations d'une part, et de ressortir les méthodes et les implications pour la conservation d'autre part.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Douze populations d'arganier ont été échantillonnées en fonction de leurs disparités éco-géographiques (**Tableau 1**).

La collecte des fruits a porté sur des populations du littoral (représentées par des échantillons des populations *Tensift*, *Tamanar* et *Sidi-Ifni*, de la Plaine de Souss (*Ademine*), de la limite du plateau de Chichaoua (*Mijji*) et finalement des populations d'altitude provenant du Haut Atlas (*Argana* et *Tizint'est*), de l'Anti Atlas (*Ait Baha*, *Tafraout*) et du début du Sahara (*Guelmim*). À titre comparatif, deux populations isolées de l'aire principale de l'arganier ont été aussi analysées. Il s'agit d'un échantillon prélevé sur le versant sud de la haute vallée de l'*Oued Grou* (sud-est de Rabat) et sur les collines de *Beni-Snassen* (nord-est de Oujda).

Pour chaque site, la surface d'échantillonnage varie entre 1 à 2 hectares sauf dans la population de Guelmim où il a fallu prospecter dans une surface de 200 m/5 000 m (vu la rareté des pieds d'arganier).

On a utilisé des feuilles jeunes et fraîches pour l'électrophorèse des isozymes. Les plants d'arganier sont issus des germinations d'amandes après concassage. La germination a été réalisée à l'étuve (25°C) sur du papier imbibé dans des boîtes de Pétri. L'effectif par population varie de 20 à 50 à raison d'une graine par arbre. Le nombre total de plantules analysées est de 332.

Le protocole expérimental est basé sur trois étapes principales : l'extraction des enzymes solubles dans un tampon Tris HCl, ensuite la migration sur gel de polyacrylamide et enfin la révélation spécifique de l'activité enzymatique (EL MOUSADIK, 1997).

Neuf systèmes enzymatiques ont été choisis (*Aap*, *Adh*, *Amy*, *Est*, *Got*, *Lap*, *Mnr*, *Skd* et *Sod*). L'interprétation des zymogrammes a permis d'étudier le polymorphisme de

12 locus (**Tableau 2**). De plus, trois autres loci monomorphes (*Sod1*, *Sod-2* et *Sod-3*) ont été pris en compte afin de pouvoir comparer la diversité génétique de l'arganier à celle des autres espèces ligneuses (Hamrick *et al.*, 1992).

L'analyse des données a été réalisée à l'aide des programmes établis par Swofford & Selander (1989), Ritland (1989) et Pons & Chauche (1995). D'autre part, afin de mieux valoriser les données isozymiques obtenues dans un but de conservation, nous avons caractérisé précisément chaque population à l'aide de paramètres génétiques décrits plus loin, dont certains sont inédits.

Tableau 1 : Liste et coordonnées des populations étudiées.

Populations	Abréviation	Situation géographique	Longitude (Ouest)	Latitude (Nord)	Altitude (m)	Bioclimat
Ademine	AD	Plaine du Souss	9°22'	30°20'	90	Aride
Aït Baha	AB	Versant Nord de l'Anti Atlas	9°12'	30°06'	550	Aride
Argana	AR	Versant Sud du Haut Atlas	9°11'	30°47'	600	Aride
Beni-Snassen	BS	Nord-Est d'Oujda	2°36'	34°51'	260	Aride
Guelmim	GO	Limite nord du Sahara	10°04'	28°58'	530	Aride
Mijji	MI	Plateau de Chichaoua	9°19'	31°33'	350	Aride
Oued Grou	OG	Sud Est de Rabat	6°35'	33°43'	400	Semi aride
Sidi Ifni	SI	Côte Atlantique	10°07'	29°26'	20	Aride
Tafraout	TA	Versant Nord de l'Anti Atlas	8°58'	29°46'	1150	Aride
Tamanar	TM	Côte Atlantique	9°36'	31°06'	170	Semi aride
Tensift	TE	Côte Atlantique	9°25'	31°54'	110	Semi aride
Tizint'est	TT	Versant sud du Haut Atlas	8°22'	30°50'	1200	Aride

Tableau 2 : Description des systèmes enzymatiques utilisés.

Enzyme (Nombre EC)	Loci	Structure	Allèles
<i>Aap</i> (EC 3.4.11.1.)	<i>Aap-1</i>	monomérique	2
<i>Adh</i> (EC 1.1.1.1.)	<i>Adh-3</i>	dimérique	2
<i>Amy</i> (EC 3.2.1.2.)	<i>Amy-1</i>	monomérique	5
<i>Est</i> (EC 3.1.1.6)	<i>Est-1</i>	monomérique	3
	<i>Est-2</i>	„	5
<i>Got</i> (EC 2.6.1.1.)	<i>Got1</i>	dimérique	2
	<i>Got-2</i>	„	5
	<i>Got-3</i>	„	5
<i>Lap</i> (EC 3.4.11.1.)	<i>Lap-1</i>	monomérique	3
	<i>Lap-2</i>	„	2
<i>Mnr-1</i> (EC 1.6.99.2.)	<i>Mnr-1</i>	tétramérique	2
<i>Skd</i> (EC 1.1.1.25.)	<i>Skd-1</i>	monomérique	2
Total	12		38

RÉSULTATS

Structure génique et génotypique intrapopulation

Au niveau génique, 38 allèles ont été dénombrés chez les 12 loci polymorphes (Tableau 2). Le nombre moyen d'allèles par locus polymorphe après raréfaction (cf. El Mousadik et Petit, 1996a) est assez variable (Tableau 3), il va de 1,4 (isolat de l'Oued Grou) à 2,2 chez la population du versant sud du Haut Atlas (Tizint'est). Notons que les populations de Tafraout et Ademine sont également assez riches. Néanmoins, quelle que soit la population, le nombre moyen d'allèles observé est toujours largement en dessous du nombre théorique 3,16. Quatre loci parmi 12 (*Amy-1*, *Est-2*, *Got-2* et *Got-3*) présentent un taux d'hétéroallélisme très élevé (cinq allèles par locus). D'autre part cinq allèles (*Est-1B*, *Got-2E*, *Got-3A*, *Got-3C* et *Got-3D*) ne figurent qu'à l'état rare, leur fréquence moyenne étant inférieure à 5 %.

Tableau 3 : Paramètres génétiques des populations et contribution à la diversité totale.

Pop	He	Ho	F _{IS}	R _[40]	D _{ST}	G _{ST}	CtHTot	CtHDiv	CtHDif	CtRTot	CtRDiv	CtRDif
AB	0,258	0,246	0,046	1,8	0,065	0,27	-0,3	-0,5	0,2	-0,9	0,2	-1,1
AD	0,328	0,296	0,098	2,1	0,052	0,22	0,8	1,4	-0,6	0,6	1,6	-1,0
AR	0,299	0,275	0,080	1,8	0,048	0,23	-0,2	0,6	-0,8	-0,3	0,2	-0,5
BS	0,305	0,271	0,111	1,7	0,148	0,29	5,8	0,7	5,1	6,1	-0,8	6,9
GO	0,223	0,157	0,296	1,8	0,071	0,27	-0,9	-1,5	0,6	3,9	0,2	3,8
MI	0,300	0,250	0,167	1,7	0,040	0,22	-0,6	0,6	-1,3	-0,8	-0,8	0,0
OG	0,170	0,172	-0,012	1,4	0,073	0,31	-2,2	-2,9	0,7	-1,6	-2,6	1,0
SI	0,236	0,217	0,080	1,7	0,045	0,24	-2,1	-1,1	-1,0	-2,0	-0,8	-1,2
TA	0,331	0,319	0,036	2,1	0,047	0,18	0,5	1,4	-0,9	1,4	2,0	-0,6
TE	0,232	0,217	0,065	1,6	0,046	0,26	-2,1	-1,2	-0,9	-2,0	-1,4	-0,6
TM	0,305	0,254	0,167	1,8	0,054	0,24	0,3	0,7	-0,4	2,3	-0,3	2,6
TT	0,340	0,307	0,097	2,2	0,051	0,21	1,1	1,7	-0,6	5,4	2,5	2,9
Mo	0,277	0,248	0,102	1,8	0,062	0,18	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0
Mo							1,0	1,1		1,1	1,1	1,9

N.B. *He* hétérozygotie attendue sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg ; *Ho* hétérozygotie observée ; *F_{IS}* indice de fixation ; *R_[40]* nombre moyen d'allèles différents après raréfaction à un effectif de 40 gènes ; *D_{ST}* différenciation absolue de la population *k* avec l'ensemble des autres ; *G_{ST}* différenciation relative de la population *k* avec l'ensemble des autres ; *CtH* contribution à la diversité totale de la population *k* (exprimé en pourcentage de *H_T*) ; *CtH_{Div}* et *CtH_{Dif}*, fraction de la contribution dues à la diversité et à la différenciation ($CtH_{tot} = CtH_{Div} + CtH_{Dif}$) ; *CtR* contribution à la richesse allélique totale de la population *k*. *Mo* moyenne (le *G_{ST}* moyen est obtenu en divisant la moyenne des *D_{ST}* par la diversité totale). *|Mo|* moyenne des valeurs absolues.

Au niveau génotypique, 57 génotypes ont été observés pour l'ensemble des populations. Le nombre de génotype varie selon les loci de 3 (*Lap-2*, *Adh-3*, *Skd-1*, *Mnr-1*, *Aap-1*, et *Got-1*) à 9 (*Amy-1*). Certains allèles n'apparaissent qu'à l'état hétérozygote : *Est-1 AB*, *Est-2 AB-AC-DC-DE* ; *Got-2 BE-AD*, *Got-3 EC-ED* et *Amy-1 AC*.

L'hétérozygotie moyenne observée varie de 0,17 (Oued Grou et Guelmim) à 0,3 (Tizint'est, Ademine et Tafraout). Cette variation d'hétérozygotie est accompagnée alors d'une variation de l'indice de fixation *F*. Ce dernier indique, pour l'ensemble des loci, un déficit généralisé d'hétérozygotie : *F_{IS}* = 0,1 (Tableau 3). Le test de χ^2 pour chaque locus par population, montre un écart significatif par rapport à la panmixie dans 26 % des cas.

Structure génétique interpopulations

L'indice de fixation à l'intérieur des populations (*F_{IS}* = 0,085) est très faible par rapport à l'indice de fixation de la population totale (*F_{IT}* = 0,265) ; cette différence reflète

l'ampleur de la différenciation entre les populations analysées : $F_{ST} = 0,197$. La différenciation est plus marquée pour les loci *Got-1*, *Got-3*, *Lap-1*, *Lap-2* et *Adh-3* (Tableau 4). Notons que le déficit en hétérozygotes sur l'ensemble des populations (F_{IT}) est dû principalement à l'hétérogénéité des fréquences alléliques entre les populations (effet Wahlund). Cela signifie que les flux géniques sont limités entre les populations, comme l'indique l'estimation du nombre de migrants par génération : $Nm = 1,0$, ou $0,9$ après correction. Si on se base sur la moyenne des fréquences des allèles « privés » (Slatkin, 1985), le nombre estimé de migrants devient élevé ($Nm = 11,9$). Ceci est dû au fait que ces allèles uniques n'apparaissent que dans deux populations (Tizint'est : *Got-2E* et *Got-3A* ; Tafraout : *Got-3C* et *Got-3D*).

Tableau 4 : F-statistiques.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>Est-1</i>	0,085	0,150	0,071
<i>Est-2</i>	0,102	0,215	0,126
<i>Got-1</i>	0,378	0,896	0,833
<i>Got-2</i>	0,058	0,212	0,163
<i>Got-3</i>	0,082	0,419	0,367
<i>Amy-1</i>	0,064	0,251	0,199
<i>Lap-1</i>	0,292	0,496	0,288
<i>Lap-2</i>	0,068	0,417	0,375
<i>Adh-3</i>	-0,029	0,600	0,611
<i>Skd-1</i>	0,138	0,193	0,064
<i>Mnr-1</i>	-0,038	0,057	0,092
<i>Aap-1</i>	0,253	0,375	0,163
Moyenne	0,085	0,265	0,197

Critères d'identification de populations particulières sur la base des marqueurs moléculaires

Pour comparer les différentes populations entre elles, nous avons non seulement utilisé des paramètres classiques tels que la diversité génique, l'hétérozygotie observée, le déficit en hétérozygotes, la richesse allélique (après raréfaction ; El Mousadik et Petit, 1996a), mais aussi des paramètres nouveaux, destinés à mieux évaluer l'intérêt pour la conservation des différentes populations (ils sont *en italique*) :

1) Hétérozygoties observées *H_o* et attendues *H_e*,

2) Indice de fixation *F_{IS}*,

3) Richesse allélique corrigée, standardisée à 40 : $R'_{[40]} = R_{[40]} - 1$,

4) *Différenciation absolue entre la population et l'ensemble des autres populations :*

$$D_{STk} = H_{Tk} - H_{Sk},$$

5) *Différenciation relative avec l'ensemble des autres populations :*

$$G_{STk} = D_{STk}/H_{Tk},$$

6) *Contribution à la diversité totale de la population k :* $CtH = (H_T - H_{T-k})/H_T$,

où H_{T-k} est la diversité totale en excluant la population k,

7) *Contribution à la richesse allélique totale de la population k :*

$$CtR_{[40]} = (R'_{T[40]} - R'_{T-k[40]})/R'_{T[40]},$$

Par ailleurs, les deux contributions à la diversité totale CtH et CtR ont été décomposées en deux termes, la contribution due à la diversité de la population, Ct_{DIV} , et la contribution due à la différenciation de la population, Ct_{DIF} .

Les résultats sont donnés dans les tableaux 3 et 5. Enfin, nous avons calculé l'importance des corrélations entre les mesures classiques et celles nouvellement proposées (Tableau 6).

La plus forte diversité génique He se rencontre dans les deux populations d'altitude Tizint'est et Taфраout, suivies de la population d'Ademine. L'isolat de Oued Grou a de loin la plus faible diversité (deux fois moins que Tizint'est), tandis que les deux populations du sud, Sidi Ifni et Guelmim, ont également une diversité génétique réduite. L'hétérozygotie observée Ho est très corrélée à la diversité théorique He ($r = 0,93$). Toutefois, elle est en moyenne plus faible, le déficit d'hétérozygotes (F_{IS}) étant presque toujours positif, sauf pour l'isolat de Oued Grou ($F_{IS} \sim 0$). La richesse allélique (standardisée à un échantillon de 40 gènes par locus) est fort corrélée à la diversité He ($r = 0,77$). Les populations les plus riches sont également Tizint'est, Taфраout et Ademine. Oued Grou a la plus faible richesse allélique, mais Tensift et Mijji (en limite nord de l'aire de distribution), ainsi que le deuxième isolat (Beni-Snassen) montrent également une richesse allélique réduite.

Les paramètres D_{ST} et G_{ST} permettent de repérer les populations les plus divergentes, indépendamment de leur diversité propre (le D_{ST} n'est pas corrélé aux deux mesures de diversité, tandis que le G_{ST} leur est négativement corrélé, $r = -0,74$ et $-0,75$). Le concept de divergence, ou différenciation, est aussi important pour évaluer l'intérêt d'une population que la diversité. Le paramètre D_{ST} permet d'estimer la différenciation absolue d'une population par rapport aux autres ; il s'agit d'une distance génétique, proche de la distance de Nei qui a servi à établir les dendrogrammes des figures 1 et 2. Cette distance génétique dépend, dans les modèles de génétique des populations, de l'effet combiné de la dérive dans des populations de taille finie, et de la mutation. Par contre, le G_{ST} , obtenu après normalisation par la diversité totale, est relié à la dérive mais aussi aux flux de gènes. La plus forte divergence, et de très loin, est trouvée pour la population isolée des Beni-Snassen ($D_{ST} = 0,148$). L'autre isolat (Oued Grou) arrive en deuxième position, avec la population sub-saharienne de Guelmim ($D_{ST} = 0,073$ et $0,071$). Pour le G_{ST} , obtenu après pondération de D_{ST} par la diversité totale, ce sont toujours les deux isolats, mais Oued Grou en tête, qui ont la plus forte valeur.

Une population, l'isolat de Beni-Snassen, contribue nettement plus à la diversité totale H_T que les autres, comme le montre la nouvelle mesure $CtH = 5,8\%$ relativement à H_T . C'est dû essentiellement à sa grande différenciation (cf. son D_{ST} très élevé, ce qui se traduit par une part importante de sa contribution CtH liée à la différenciation : $CtH_{DIF} = 5,1\%$). Elle est d'autre part caractérisée par une diversité à peine plus élevée que la moyenne ($CtH_{DIV} = 0,7\%$). À l'autre extrême, on trouve l'autre isolat de Oued Grou. Bien que cette population soit également bien différenciée des autres populations ($CtH_{DIF} > 0$), sa diversité nettement inférieure à la moyenne engendre une contribution nette à la diversité totale négative ($CtH = -2,2\%$). Les populations du nord de l'aire, à la fois peu différenciées et peu variables, contribuent également à faire diminuer la diversité totale, mais on imagine mal que sa valeur soit négative. Les résultats concernant la contribution à la richesse allélique sont assez similaires, mais néanmoins complémentaires. C'est de nouveau l'isolat de Beni-Snassen qui contribue le plus à la richesse allélique totale. Toutefois, il est suivi de peu par la population du Haut-Atlas, Tizint'est. La population de Guelmim est également mise en relief par ce critère. On retrouve les mêmes populations du nord pour les plus faibles contributions.

Il faut noter que la fraction de la contribution due à la différenciation est plus élevée en moyenne que celle due à la diversité (cf. dernière ligne du tableau 3). Globalement d'ailleurs, la richesse allélique totale calculée sur 12 populations est plus élevée (de 1 %) que celle basée sur 11 populations, alors que la diversité *H* reste inchangée quand on passe de 11 à 12 populations.

Tableau 5 : Classement par ordre croissant des populations en fonction de leur contribution à la diversité intrapopulation et interpopulation.

Pop.	$R_{[40]}$	H_o	H_e	F_{IS}	$Ct(R_{[n]})$	$Ct(H)$	D_k	D_{STk}	G_{STk}
AB	5	8	8	3	9	7	3	4	4
AD	3	3	3	8	6	3	6	6	9
AR	4	4	7	6	7	6	8	8	8
BS	10	5	4	9	1	1	1	1	2
GO	6	12	11	12	3	9	2	3	3
MI	9	7	6	11	8	8	12	12	10
OG	12	11	12	1	10	12	4	2	1
SI	8	10	9	5	12	10	11	11	7
TA	2	1	2	2	5	4	9	9	12
TE	11	9	10	4	11	11	10	10	5
TM	7	6	5	10	4	5	5	5	6
TT	1	2	1	7	2	2	7	7	11

Tableau 6 : Matrice de corrélation entre les différents paramètres de diversité génétique.

	H_e	H_o	F_{IS}	$R_{[40]}$	D_{ST}	G_{ST}	CtH
H_o	0,93***						
F_{IS}	0,09	-0,28					
$R_{[40]}$	0,77**	0,73**	0,11				
D_{ST}	-0,06	-0,09	0,06	-0,26			
G_{ST}	-0,75**	-0,74**	0,01	-0,75**	0,63*		
CtH	0,61*	0,54	0,11	0,30	0,76**	0,01	
$CtR_{[40]}$	0,47	0,30	0,46	0,46	0,57	-0,02	0,77**

N.B. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

DISCUSSION

Structure génétique intra et interpopulations

Il est difficile en fait de savoir pour une telle étude ce qui limite la précision des paramètres de diversité. Nei (1976) considère qu'un nombre faible d'individus analysés n'est pas un inconvénient si le nombre de locus est élevé (plus de 50 !). Mais, pour

plusieurs raisons on se trouve généralement loin de l'effectif souhaité en marqueurs. Pons et Petit (1995) ont montré à la fois analytiquement et empiriquement, à l'aide de techniques de rééchantillonnage (*bootstrap*) qu'il est préférable d'augmenter le nombre total de populations plutôt que l'effectif des populations, pour les estimations en un locus donné, et ceci d'autant plus que la différenciation est forte, ce qui est le cas chez l'arganier.

L'organisation de la diversité génétique est mieux décrite à l'aide de plusieurs paramètres complémentaires, puisque tout paramètre, même synthétique, a ses limites théoriques et pratiques, les concepts sous-jacents à la diversité étant multiples. Les résultats obtenus sur l'arganier montrent que le nombre d'allèles (richesse allélique) est assez corrélé à la diversité de Nei. Toutefois, cette corrélation n'est pas systématique (Nevo *et al.*, 1981 ; El-Kassaby et Ritland, 1996 ; Kjaer et Siegismund, 1996). De plus, une meilleure description de la diversité génétique doit être menée sur la base des fréquences alléliques et génotypiques (Ouazzani, 1993 ; Fineschi *et al.*, 1994). En effet, la distance de Nei, par exemple (basée uniquement sur les fréquences alléliques), ne tient pas compte des différences locales du système de reproduction (des populations de composition génotypique très différente peuvent avoir des fréquences alléliques identiques).

Jusqu'à présent, les seules données disponibles sur la structuration des populations d'arganier ont été obtenues à partir des caractères du fruit et de la graine (Ferradous, 1995). Cette étude a porté sur 30 arbres de trois stations (Argana, Ait Baha et Ademine). Les résultats ont montré une grande similitude entre les trois stations pour les caractères étudiés (poids, longueur, largeur et rapport (L/l) de la graine et fruit). Avec les allozymes, ces trois stations (AR, AD et AB) ont également montré un niveau de ressemblance assez élevé ($d < 0,038/12$ loci, El Mousadik, 1997) tout en étant significativement différenciées. Cette confrontation des données morphologiques et enzymatiques mérite d'être développée. Il serait pour cela intéressant de disposer des valeurs additives d'un nombre de caractères mesurés dans des tests de provenances et de descendances. De tels tests restent à installer chez l'arganier.

À propos des relations entre distance génétique et distribution géographique, nous avons constaté chez les populations d'arganier que le degré de ressemblance est en gros compatible avec l'isolement géographique (El Mousadik, 1997), bien que le nombre de populations soit trop faible pour tester rigoureusement l'isolement par distance. Chez les arbres forestiers, des corrélations entre distance géographique et génétique ont été trouvées (Lundkvist, 1979 ; Liengsiri *et al.*, 1995 ; Gibson et Wheelwright 1995 ; Michaud *et al.*, 1995). D'autres ont au contraire montré l'absence d'une telle liaison entre distance génétique et géographique (Alden et Loopstra, 1987 ; Berg et Hamrick, 1993 ; Goncharenko *et al.*, 1994 ; Khasa *et al.*, 1994).

Dans la littérature, c'est surtout le G_{ST} qui est utilisé pour mesurer le degré de différenciation entre populations. On trouve généralement chez les espèces à large distribution, que les flux géniques sont très élevés. Le G_{ST} chute souvent à moins de 4 % (cas des chênes (*Quercus robur*, Zanetto *et al.* 1994 ; *Q. ilex* Michaud *et al.*, 1995) et de Douglas (Hoffmann et Geburek, 1995). À l'inverse, de fortes différenciations entre populations ont été enregistrées chez des espèces à aire de répartition morcelée ou à distribution discontinue (*Pinus torreyana*, $G_{ST} = 1,00$, Ledig et Conkle, 1983 ; *P. halepensis*, $G_{ST} = 0,30$, Schiller *et al.*, 1986 ; *P. maritima*, $G_{ST} = 0,17$, Petit *et al.*, 1995 ; *P. brutia*, $G_{ST} = 0,16$, Conkle *et al.*, 1988) ou bien chez des provenances d'*Eucalyptus* de Hawaï ($G_{ST} = 0,21$, Aradhya et Phillips, 1993).

Il faut parfois être prudent avec ces estimations de différenciation génétique quand elles sont basées sur un faible nombre de locus et de populations. En effet, pour des

espèces proches, selon l'échantillonnage des loci, des populations et des régions géographiques, des résultats assez différents ont été trouvés (El-Kassaby, 1991). Ainsi, chez *Racosperma mangium*, Moran *et al.* (1989) ont trouvé un G_{ST} de 0,31 (avec 19 loci et 11 populations), alors que Khasa *et al.* (1994) ont trouvé une valeur de 0,09 (avec 16 loci et 13 populations). Chez *Acacia auriculiforme*, le G_{ST} obtenu par Wickneswari et Norwati (1993) était de 0,27 pour 10 loci et 18 populations; alors qu'il n'était que de 0,18 d'après ; Khasa *et al.* (1994) pour 14 loci et 13 populations.

Hamrick *et al.* (1992) ont fait une synthèse portant sur 322 espèces ligneuses ; ils ont comparé les résultats de diversité intrapopulation (*en incluant les loci monomorphes*) et interpopulation. Ils concluent notamment que la distribution géographique de l'espèce est un bon prédicteur de la variation génétique entre populations (aire endémique, régionale ou continentale). Par contre, les espèces à large distribution ont un pourcentage de locus polymorphe et une diversité intrapopulation plus élevés.

Afin de pouvoir effectuer une comparaison avec les valeurs moyennes des arbres forestiers (**Tableau 8**), notons tout d'abord que l'arganier possède un système de reproduction supposé de type allogame, une dissémination des graines par les animaux et une distribution limitée. On remarque que l'arganier possède une diversité ($He = 0,217$) plus élevée que la moyenne des Angiospermes ($He = 0,143$), mais aussi supérieure à celle rencontrée pour les espèces à distribution limitée ou *a fortiori* endémique, quelle que soit leur distribution en zone tempérée ou tropicale, ou leur mode de pollinisation ; par contre, cette diversité élevée est du même niveau que celle rencontrée chez les espèces dont les graines sont ingérées par des animaux. En ce qui concerne la différenciation (G_{ST}), elle est chez l'arganier plus élevée que chez toutes les autres catégories d'espèces d'arbres forestiers étudiées. Notons que chez l'arganier, en tant qu'Angiosperme à distribution limitée et à pollinisation entomophile, une différenciation plus élevée que la moyenne pouvait être prédite, d'après les résultats décrits au tableau 8. Toutefois, la valeur élevée obtenue n'est pas entièrement expliquée par l'appartenance aux différentes catégories du tableau.

Tous les facteurs évolutifs étudiés par Hamrick *et al.* (1992) peuvent influencer le niveau et l'organisation génétique des populations naturelles. Le coefficient de différenciation varie en particulier d'une façon considérable selon le mode de reproduction et l'importance des flux de graine et de pollen. Du fait de l'absence de flux géniques par le pollen, la différenciation G_{ST} est très élevée chez les espèces strictement autogames (exemple, *Bromus tectorum* $G_{ST} = 0,48$, Novak *et al.*, 1991). Chez les allogames, les espèces à pollinisation entomophile sont généralement plus différenciées que les espèces à pollinisation anémophiles : par exemple, le G_{ST} a été estimé à 21 % chez l'Eucalyptus (Aradhya et Phillips, 1993) et à seulement 6 % chez les conifères anémophiles (Hamrick et Godt, 1990).

En outre, on sait que les facteurs écologiques influençant la floraison, non considérés par Hamrick *et al.* (1992), peuvent aussi partiellement expliquer le niveau de structuration génétique des populations (Young *et al.*, 1993). Chez l'arganier, une première étude au niveau de trois stations géographiquement proches mais écologiquement différentes (Belmouden *et al.*, 1995), a montré un effet hautement significatif de la localité sur le nombre de glomérules florifères, le pic de floraison étant séparé d'un mois environ entre les trois stations (Argana, Ademine et Ait Baha). Un tel décalage ne favorise pas les flux de gènes entre populations. Cela pourrait donc expliquer le niveau de différenciation élevé des populations d'arganier, outre l'isolement et l'éloignement géographique de certaines stations.

Tableau 7 : Diversité génétique intra et interpopulation des arbres forestiers (d'après Hamrick *et al.*, 1992), comparés à l'arganier

Catégories	<i>N</i>	<i>L</i>	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>He</i>	<i>G_{ST}</i>
Taxon						
Gymnospermes	8,9	17,3	53	1,8	0,151 (0,008)	0,073 (0,010)
Angiospermes	9,5	18,9	45	1,7	0,143 (0,010)	0,102 (0,012)
Distribution						
Endémique	8,5	21,8	26	1,5	0,056 (0,010)	0,141 (0,049)
Limitée	5,3	21,1	44	1,6	0,143 (0,010)	0,124 (0,016)
Large distribution	5,4	14,0	74	2,6	0,228 (0,003)	0,033 (0,009)
Distribution						
Tempérée	12,2	17,7	49	1,8	0,145 (0,008)	0,092 (0,010)
Tropicale	2,9	21,3	40	1,5	0,125 (0,012)	0,119 (0,025)
Pollinisation						
Entomophile	4,6	19,5	48	1,7	0,163 (0,011)	0,099 (0,017)
Anémophile	11,3	17,51	53	1,8	0,154 (0,008)	0,077 (0,009)
Dissémination						
des graines						
Ingestion	21,0	41	60	1,9	0,208 (0,022)	0,051 (0,010)
Vent	8,4	18,3	51	1,8	0,149(0,008)	0,076 (0,009)
<i>Argania spinosa</i>	12	15	48	1,7	0,217 (0,063)	0,197 (0,073)

N : Nombre de populations . *L* : nombre de locus ; *P* : proportion de locus polymorphes ; *A* : Nombre moyen d'allèles par locus.

Chez l'arganier, le degré de différenciation obtenu par les isozymes et l'ADNcp ($G_{STn} = 20\%$, $G_{STc} = 60\%$, El Mousadik et Petit, 1996b) a été comparé avec les valeurs observées chez d'autres arbres forestiers (**Tableau 7**). L'espèce *Eucalyptus nitens* montre la plus grande similitude avec l'arganier à la fois pour les données isozymiques et pour celles de l'ADNcp. Notons que l'eucalyptus est considéré comme étant un arbre entomophile avec un mode de dissémination des graines qui n'est pas clairement déterminé (Byrne et Moran, 1994). Dans tous les cas rapportés au tableau 8, comme on s'y attendait sur des bases théoriques (Petit *et al.*, 1993a), le degré de subdivision de la diversité obtenu avec l'ADNcp est plus important qu'avec les isozymes (marqueurs nucléaires). Cependant, cette différence est beaucoup plus forte chez des espèces comme le hêtre et le chêne. Dans certaines conditions, le G_{ST} nucléaire et cytoplasmique peuvent être reliés pour estimer les taux de migration par graine et par pollen (Petit, 1992 ; Petit *et al.*, 1992, 1993a ; Ennos, 1994). En l'absence de données confirmant la transmission maternelle de l'ADNcp chez l'arganier, nous avons retenu cette hypothèse puisqu'à priori c'était le cas général des angiospermes (Neale et Sederoff, 1989). Le rapport des taux de migration (5) assez faible chez l'arganier est relativement proche de celui enregistré chez l'eucalyptus (1,8) et le douglas (7) (conifère avec dissémination éolienne du pollen et des graines). Tandis qu'il est très fort chez le hêtre et le chêne où la dissémination des graines se fait par les oiseaux et

celle du pollen par le vent. Chez l'arganier, la connaissance des trajets parcourus et la reconstitution de l'histoire du mode de dissémination des graines après ingestion par les animaux (caprins, camélins, antilopes et autres) sera intéressante pour mieux comprendre comment les populations d'arganier sont structurées. D'autre part, bien que les valeurs semblent comparables à celles d'autres espèces entomophiles, il est nécessaire de confirmer cette hypothèse pour comprendre l'ensemble des facteurs biologiques régissant la structuration géographique de l'arganier.

Tableau 8. Comparaison de la différenciation génétique obtenue par des marqueurs nucléaires (isozymes) et des marqueurs cytoplasmiques (ayant une hérédité maternelle) chez des espèces forestières.

Espèces	G _{STn}	Référence	G _{STc}	Référence	$\frac{m_p}{m_s}$
<i>Argania spinosa</i>	20 %	cette étude	60 %	El Mousadik & Petit 1996b	5
<i>Eucalyptus nitens</i>	30 %	Moran, 1992	62 %	Byrne & Moran, 1994	1.8
<i>Fagus sylvatica</i>	5.4 %	Comps <i>et al.</i> , 1990	83 %	Demesure <i>et al.</i> 1996	84 ^d
<i>Pinus contorta</i>	9 %	Wheeler & Guries, 1982	72 % ^b	Dong & Wagner, 1993	24
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	24 %	Li & Adams, 1988	73 % ^c	Aagaard <i>et al.</i> 1995	7
<i>Quercus petraea</i>	2.4 %	Zanetto <i>et al.</i> , 1994	90 %	Petit <i>et al.</i> , 1993b	500
<i>Quercus robur</i>	3.2 %	Zanetto <i>et al.</i> , 1994	92 %	Petit <i>et al.</i> , 1993b	286

Dans ces espèces le mode de transmission de l'ADNcp est inconnu, mais l'hérédité est supposée du type maternel

Il s'agit ici de l'ADN_{mt}. Estimation obtenue avec des fragments RAPD hérités maternellement (probablement ADN_{mt}).

Au niveau intrapopulation, l'analyse des structures génotypiques de l'ensemble des individus du sud ouest marocain a mis en évidence une déviation significative par rapport à la panmixie avec une tendance générale vers un déficit d'hétérozygotes (El Mousadik et Fakir, 1995). Hartl et Clark (1989) ont considéré qu'un léger déficit d'hétérozygotie est fréquemment dû à l'effet Wahlund, qui apparaît lorsque les populations échantillonnées sont elles-mêmes subdivisées en groupes d'individus caractérisés par des fréquences hétérogènes. Brown (1979) a expliqué qu'un déficit généralisé d'hétérozygotes se retrouve chez les espèces préférentiellement allogames (Paradoxe de l'hétérozygotie). Dans la littérature, un surplus d'homozygotes a été souvent rencontré chez des espèces allogames très longévives. C'est le cas par exemple chez *Fagus sylvatica* (Gregorius *et al.*, 1986 ; Comps *et al.*, 1990), *Quercus petraea* et *Q. robur* (Bacilieri *et al.*, 1994) et *Ocotea tenera* (Gibson et Wheelwright, 1995). Ces derniers auteurs suggèrent qu'une dispersion limitée du pollen et/ou des graines donne lieu à un tel déficit. En effet, des différenciations génétiques importantes apparaissent alors sur des petites distances. Prat (1995) explique que le déficit d'hétérozygotie chez *Pseudotsuga menziesii* est dû probablement aux croisements qui ont lieu principalement entre les quelques arbres voisins.

Finalement, dans la zone d'étude (Sud-Ouest marocain), la discontinuité génétique observée entre la population d'altitude de Tafraout, caractérisée par la présence d'allèles rares, et celle d'Ait Baha, pourrait être liée à l'absence de flux de gènes entre des populations séparées par des zones d'altitude supérieure à 1200 mètres où l'arganier ne pousse pas. L'isolement de la population de Guelmim contribuerait également à sa forte différenciation génétique. Pour mettre en évidence de tels phénomènes, il faudrait envisager une étude détaillée de la distribution spatiale des formes alléliques d'isozymes ou d'autres marqueurs, en échantillonnant intensivement des populations sur l'ensemble de l'aire. L'analyse des autocorrélations spatiales

pourrait alors être effectuée pour tester l'existence et mesurer l'échelle de la structuration géographique (Sokal et Oden, 1978).

Diversité génétique et implications pour la conservation

Le calcul de la contribution de chaque population à la diversité totale (diversité génique de Nei, ou richesse allélique, grâce à la technique de raréfaction), et sa décomposition en deux composantes dues à la diversité et à la différenciation de la population par rapport au reste, constitue une nouvelle approche méthodologique adaptée à la conservation. Les particularités de chaque population peuvent ainsi être mises en évidence. Une population ayant une forte diversité n'est pas nécessairement la plus différenciée génétiquement des autres populations : les deux composantes de la contribution à la diversité peuvent être de signe égal ou opposé (cf. Tableau 3). Nous avons vu que les populations, comparées deux à deux, montrent parfois des différences extrêmes. Les populations isolées (Beni-Snassen surtout), marginales (Guelmim) ou de haute altitude, sont souvent singulières, malgré une diversité réduite (sauf pour les populations d'altitude, qui sont de plus très variables). Leur perte serait donc dommageable. Des populations comme Ademine ou Argana, bien représentatives et relativement variables, sont également intéressantes à un autre point de vue. Enfin, certaines populations du nord de l'aire (Tensift, Mijji) mais aussi du sud (Sidi Ifni), à la fois peu variables et peu différenciées, pourraient être considérées comme moins intéressantes. En fait, les résultats obtenus au chapitre suivant, à l'aide de l'ADN chloroplastique, montrent que c'est la population de Tensift qui est la plus originale, puisqu'elle est fixée pour un variant chloroplastique qui n'a été retrouvé nulle part ailleurs ! De tels résultats justifient bien l'importance d'examiner le comportement de chaque population, en fonction du marqueur étudié, avant de décider toute politique de conservation. On obtient de cette façon un maximum d'informations permettant une utilisation rationnelle des données acquises, et susceptibles de faciliter les échantillonnages futurs. Il est cependant très souhaitable de compléter nos données avec un nombre de loci et de populations plus élevé, et éventuellement des effectifs plus élevés par population, afin d'identifier plus d'allèles rares. Une étude de simulation visant à maximiser la richesse allélique dans des collections a montré l'influence du nombre de loci (neutres) pris en compte sur l'efficacité de la conservation, évaluée d'après la richesse allélique à des locus sélectionnés (Bataillon *et al.*, 1996).

Dans une étude similaire à la notre, réalisée sur le Douglas (avec 17 locus polymorphes et 49 populations), El-Kassaby et Ritland (1996) ont calculé les corrélations de différents paramètres génétiques (richesse allélique A (non standardisée, malgré des effectifs variables par population), diversité génétique H et divergence D (autre estimation proche de notre D_{ST} de la différenciation entre chaque population et l'ensemble des autres populations), et leur rôle pour la conservation. Malgré une différenciation quasi inexistante entre leurs populations, comparé au cas de l'arganier, ils concluaient qu'il serait dangereux d'en déduire que quelques populations suffisent à représenter le tout : il existe en effet toujours des allèles qu'on ne trouve que dans un sous-ensemble des populations, et qui pourraient facilement être perdus si on écarte *a priori* certaines populations. Yang et Yeh (1992) concluent différemment, mais leur approche est limitée à l'étude de quelques paramètres pour chaque population.

Finalement, à la lumière des données actuelles (richesse allélique, structuration génétique intra et interpopulations), la stratégie de conservation des ressources d'arganier devrait viser à un maintien d'une organisation spatiale de la diversité

génétique des populations sur l'ensemble de la distribution naturelle de l'espèce. Cette approche devrait considérer la variabilité génétique déjà existante, et préserver la dynamique évolutive de l'ensemble, en évitant un morcellement trop prononcé des populations. En effet, il ne faut pas perdre de vue l'importance des flux de gènes par pollen dans la conservation génétique des plants ; Elistrand (1992) a discuté l'effet bénéfique des flux de gènes par pollen pour atténuer la dépression liée à la consanguinité des populations de petite taille. Chez le Douglas, Prat (1995) a étudié les modalités de dispersion du nuage pollinique en utilisant les marqueurs isozymiques. Il a constaté notamment l'influence des vents dominants dans la dissémination du pollen. Enfin, combiner les données moléculaires et celles issues des caractères adaptatifs ne peut être que bénéfique pour la gestion des ressources génétiques d'arganier, la forte différenciation mise en évidence pour les caractères moléculaires pouvant être encore plus forte pour des caractères adaptatifs si les différences dans les conditions environnementales sont très marquées.

Remerciements

Nos sincères remerciements sont adressés aux responsables de la collaboration franco-marocaine (cadre PRC) et germano-marocaine par le biais du Coordinateur du Projet *Conservation et Développement de l'Arganeraie*.

Bibliographie

1. AAGAARD J.E., VOLLMER S.S., SORENSEN F.C., STRAUSS S.H. 1995. Mitochondrial DNA products among RAPD profiles are frequent and strongly differentiated between races of Douglas-fir. *Molecular Ecology*, 4: 441-447.
2. ARADHYA K.M., PHILLIPS V.D. 1993. Genetic Variability in fourteen provenances of Eucalyptus species in Hawaii. *Silvae Genetica*, 42: 9-15.
3. BACILIERI R., LABBE T., KREMER A. 1994. Intraspecific genetic structure in a mixed population of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl and *Quercus robur*. *Heredity*, 73: 130-141.
4. BATAILLON T.M., DAVID J.L., SCHOEN 1996. Neutral genetic markers and conservation genetics: Simulated germplasm collections. *Genetics (in press)*.
5. BELMOUDEN S., BANI AAMEUR F., DUPUIS P. 1995. Distribution des glomérules florifères selon le type de rameau de l'arganier. Poster dans : Colloque International : *La forêt face à la désertification « cas des arganeraies »*. Agadir 26-28 octobre. p 82.
6. BROWN A.H.D. 1979. Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theor. Pop. Biol.*, 15:1-42.
7. BYRNE M., MORAN G.F. 1994. Population divergence in the chloroplast genome of *Eucalyptus nitens*. *Heredity*, 73: 18-28.
8. COMPS B., THIÉBAUT B., PAULE L., MERZEAU D., LETOUZEY J. 1990. Allozymic variability in beech woods (*Fagus sylvatica* L.) over central Europe : Spatial differentiation among and within populations. *Heredity*, 65: 407-417.
9. CONKLE M.T., SCHILLER G., GRUNWALD C. 1988. Electrophoretic analysis of diversity and phylogeny of *Pinus Brutia* and closely related taxa. *Syst. Bot.*, 13: 411-424.
10. DEMESURE B., COMPS B., PETIT R.J. 1996. Phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe inferred by restriction studies of PCR-Amplified chloroplast DNA fragments. *Evolution, (in press)*.
11. DONG J., WAGNER D.B. 1993. Taxonomic and population differentiation of mitochondrial diversity in *Pinus banksiana* and *Pinus contorta*. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 573-578.
12. EL KASSABY Y.A., 1991. Genetic variation within and among conifer populations : review and evaluation of methods. In *biochemical markers in the population genetics of forest trees*.

- Ed. by S. Fineschi, M.E. Malvoti, F. Cannot and H.H. Hattemer, S.P.B. Acad. Pub. The Hague, pp 61-76.
13. EL KASSABY Y.A., RITLAND K. 1996. Genetic variation in low elevation Douglas-fir of British Columbia and its relevance to gene conservation. *Biodiversity and conservation*, 5: 779-794.
 14. EL MOUSADIK A., 1997. Organisation de la diversité génétique de l'arganier *Argania spinosa* L. Skeels. Apport des marqueurs nucléaires et cytoplasmique. Thèse Doct. d'Etat. Univ. Ibnou Zohr Agadir. pp112.
 15. EL MOUSADIK A., PETIT R.J. 1996a. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 832-839.
 16. EL MOUSADIK A., PETIT R. 1996b. Chloroplast DNA Phylogeography of the argan tree of Morocco. *Molecular Ecology*, 5: 547-555.
 17. EL MOUSADIK A., FAKIR S. 1995. Analyse de la variabilité génétique des populations endémiques d'arganier (*Argania spinosa*). Comm. sous presse dans : Colloque international. *La forêt face à la désertification « cas des arganeraies »*. Agadir, 26 au 28 octobre.
 18. ELISTRAND N.C. 1992. Gene flow by pollen : implications for plant conservation genetics *Oikos*, 63: 77-86.
 19. ENNOS R.A. 1994. Estimating the relative rate of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72: 250-259.
 20. FERRADOUS A. 1995. Diversité génétique de quelques caractères morphologiques du fruit et de la graine d'arganier. (*Argania spinosa* L. Skeels). Thèse de 3^e cycle Université Ibnou Zohr. Agadir, pp 189.
 21. FINESCHI S., MULVOLI M.E., MORGANTE M., VENDRAMIN G.G., 1994. Allozyme variation within and among cultivated varieties of Sweet chestnut (*Castanea sativa*). *Can. J. For. Res.*, 24: 1160-1165.
 22. GIBSON J.P., WHEELWRIGHT N.T. 1995. Genetic structure in a population of a tropical tree *Ocotea tenera* (Lauraceae) : influence of avian seed dispersal. *Oecologia*, 103: 49-54.
 23. GREGORIUS H.R., KRAUHANSEN J., MULLER-STRACK G. 1986. Spatial and temporal genetic differentiation among the seeds in a stand of *Fagus sylvatica* L. *Heredity*, 58: 255-262.
 24. HAMRICK J.L., GODT M.J.W. 1990. Allozyme diversity in plant species : In Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. (eds) *Plant population genetics, breeding and genetics resources*. Sinauer, Sunderland, pp 43-63.
 25. HAMRICK J.L., GODT M.J.W., SCHERMAN-BRAYLESS S.T. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest*, 6: 95-124.
 26. HARTL D.L., CLARCK A.G. 1989. Principles of population genetics. 2nd ed. Sinauer, Sunderland.
 27. HOFFMANN C., GEBUREK T. 1995. Allozyme variation of indigenous Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco] populations and their descendants in Germany. *Silvae Genetica*, 44: 222-225.
 28. KHASA P.D., CHELIAK W.M., BOUSQUET J. 1994. Genetic variation in 26 populations of *Racosperma auriculiforme* and *Racosperma mangium* using allozymes. *Can. J. For. Res.*, 24: 1123-1132.
 29. KJÆR E.D., SIEGISMUND H.R. 1996. Allozyme diversity in two Tanzanian and two Nicaraguan landraces of teak (*Tectona grandis* L.). *Forest Genetics*, 3 (1): 45-52.
 30. LEDIG F.T., CONKLE M.T. 1983. Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic. Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr.). *Evolution*, 37: 79-85.
 31. LIENGSIRI C., YEH F.C., BOYLE T.J.B. 1995. Isozyme analysis of a tropical forest tree, *Petrocarpus macrocarpus* Kruz. in Thailand. *For. Ecol. Manage.*, 74: 13-22.
 32. LUNDKVIST K. 1979. Allozyme frequency distributions in four Swedish populations of Norway spruce (*Picea abies* K.). *Hereditas*, 90: 127-143.
 33. MICHAUD H., TOUMI L., LUMARET R., ROMANE T.X LI., DI GUSTO F. 1995. Effect of geographical discontinuity on genetic variation in *Quercus ilex* L. (Holm oak). Evidence from enzyme polymorphism. *Heredity*, 74: 590-606.
 34. MORAN G.F. 1992. Patterns of genetic diversity in Australian tree species. *New Forests*, 6: 49-66.
 35. MORAN G.F., MUONA O., BELL J.C. 1989. *Acacia mangium*: A tropical forest tree of the coastal lowlands with low genetic diversity. *Evolution*, 43 (1): 231-235.
 36. NEALE D.B., SEDEROFF R.R. 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in Loblolly pine. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 212-216.

37. NÈGRE R. 1962. Petite flore des régions arides du Maroc Occidental. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris.
38. NEI M. 1976. F-Statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Human Genet.*, 41: 225-233.
39. NEVO E., BAR-EL C., BAR Z., BEILES A. 1981. Genetic Structure and climatic correlates of desert landsnails. *Oecologica*, 48: 199-208.
40. NOVAK SJ, MACK R.N., SOLTIS D.E. 1991. Genetic variation in *Bromus tectorum* (Poaceae): Population differentiation in its north American range. *Am. J. Bot.* 78 (8). 1150-1161
41. OUAZZANI N. 1993. Étude de la variabilité et les ressources génétiques de l'olivier (*Olea europaea* L.) à l'aide du polymorphisme enzymatique. Thèse Docteur es-sciences I A. V Hassan II. Rabat. pp 70 + annexes.
42. PETIT R.J. 1992. Polymorphisme de l'ADN chloroplastique dans un complexe d'espèces. les chênes blancs européens. Approche de génétique des populations. Thèse, Univ. Paris XI. pp 115 + Annexes.
43. PETIT R.J., KREMER A., WAGNER D.B. 1993a. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 122-128.
44. PETIT R.J., KREMER A., WAGNER D.B. 1993b. Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity*, 71: 630-641.
45. PETIT R.J., KREMER A., BACILIERIE R., DUCOUSSO A., ZANETTO A. 1992. Structuration génétique chez les chênes blancs européens. In : complexe d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes, pp. 155-163 Bureau des Ressources Génétiques Eds, Lavoisier, Cachan.
46. PONS O., CHAOUCHE K. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. II. Diploid locus. *Theor. Appl. Genet.*, 91:122-130.
47. PONS O., PETIT R.J. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity I Haploïd locus. *Theor. Appl. Genet.*, 90: 462-470.
48. PRAT D. 1995. Mating system in a Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco) Seed orchard. II Effective pollen dispersal. *Ann. Sci. For.*, 52: 213-222.
49. SHILLER G., CONKLE M.T., GRUNWALD C. 1986. Local differentiation among Mediterranean populations of Aleppo pine in their isoenzymes. *Silvae Genetica*, 35: 11-19.
50. SLATKIN M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39: 53-65.
51. SOKAL R.R., ODEN N.L. 1978. Spatial autocorrelation in Biology. 1; *Methodology. Biol. J. Linn.*, 10: 199-228.
52. SWOFFORD D.L., SELANDER R.B. 1989. Biosys I: A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics user manuals. Univ. of Illinois, Urbana.
53. WHEELER N.C., GURIES R.P. 1982. Population structure, genic diversity, and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. *Can. J. For. Res.*, 12: 595-606.
54. WICKNESWARI R., NORWATI M. 1993. Genetic diversity of natural populations of *Acacia auriculiformis*. *Aust. J. Bot.*, 41: 65-77.
55. YANG R.C., YEH F.C. 1992. Genetic Consequences of in situ and ex situ conservation of forest trees. *For. Chron.*, 68: 720-729.
56. YOUNG A.G., WARWICK S.I., MERIAM H.G. 1993. Genetic variation and structure at three spatial scales for *Acer saccharum* (Sugare maple) in Canada and the implications for conservations. *Can. J. For. Res.*, 23: 2568-2578.
57. ZANETTO A., ROUSSEL G., KREMER A. 1994. Geographic variation of inter-specific differentiation between *Quercus Robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Forest Genetics*, 1(2): 111-123.

D7 : Analyse de la diversité et des potentialités de fixation d'azote d'une collection locale de *Rhizobium nodulant le haricot*

MHAMDI R., AOUANI M.E., JEBARA M., GHRIR R., MARS M.

Laboratoire de Biochimie Végétale et Symbiotes, INRST. B.P. 95 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

INTRODUCTION

Les *Rhizobium* sont des bactéries du sol capables de fixer l'azote atmosphérique. Ces bactéries sont d'une importance considérable en agriculture à cause de leur capacité d'améliorer le rendement de culture des légumineuses chez lesquelles elles forment des structures spécialisées : les nodosités racinaires au niveau desquels l'azote moléculaire est réduit en ammoniac qui constitue une forme assimilable par la plante.

Parmi ces légumineuses, le haricot, par ses graines riches en protéines : 18 à 30 % du poids sec de la graine (Mutschler & Bliss, 1981) est considéré parmi les plus importantes. Cependant, il est classé parmi les légumineuses les moins cultivées en Tunisie. En effet, la production nationale du haricot est encore loin de satisfaire les besoins de la consommation en hausse, d'où le recours à l'importation.

Cette faible productivité peut être expliquée, entre autres, par une mauvaise exploitation des potentialités de la fixation symbiotique de l'azote qui pourrait être due à : (i) une absence totale de *Rhizobium* spécifiques, (ii) une faible infectivité des souches indigènes de *Rhizobium*, (iii) une mauvaise efficacité des souches existantes. Par ailleurs, l'utilisation de nouveaux cultivars et de nouvelles aires de culture rend l'inoculation indispensable pour l'amélioration des rendements de cette légumineuse.

Chez les *Rhizobium* les gènes essentiels pour la nodulation (gènes nod) et pour la fixation d'azote (gènes nif et fix) sont généralement localisés sur des plasmides géants dits plasmides symbiotiques (pSym). À côté de ces plasmides symbiotiques, les *Rhizobium* hébergent également d'autres plasmides cryptiques (Prakasch & Atherley, 1986).

Les bactéries symbiotiques du haricot sont très diversifiées. En effet, plusieurs taxons ont été caractérisés. L'utilisation des approches moléculaires (hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN, PCR-RFLP) a permis de les classer en trois espèces : (i) *R. leguminosarum* biovar (bv.) *phaseoli* (Jordan, 1984), (ii) *R. tropici* (Martinez-Romero et al., 1991), (iii) *R. etli* biovar *phaseoli* (Segovia et al., 1993). Les deux premières espèces (*R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* et *R. etli* bv. *Phaseoli*) nodulent typiquement *Phaseolus vulgaris* et possèdent des copies multiples du gène *nif H* codant pour la nitrogénase (Quinto et al., 1982; Martinez et al., 1985).

La troisième espèce, *R. tropici* se distingue par sa capacité de noduler *Phaseolus vulgaris*, mais également la légumineuse tropicale *Leucaena spp.* *Rhizobium tropici* possède une seule copie du gène *nifH* (Martinez et al., 1985; Martinez et al., 1988).

Récemment, d'autres espèces génomiques ont été isolées des sols français (Géniaux et al., 1993; Laguerre et al., 1993).

Dans le cadre d'un programme d'étude de l'apport de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique pour le développement de la culture du haricot en Tunisie, nous avons entrepris un travail d'évaluation des populations locales des *Rhizobium* nodulant cette

plante. Ce travail a pour objectifs de : i) Constituer une collection locale de *Rhizobium* du haricot, ii) Evaluer l'efficacité symbiotique des isolats de cette collection, iii) Examiner le niveau de diversité génétique par analyse des profils plasmidiques et par RFLP en utilisant des sondes plasmidiques (*nifH*, *nodB*).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Deux variétés de haricot, *Phaseolus vulgaris*, (Coco et Royalnel) ont été utilisées pour la récupération des isolats de *Rhizobium*. La variété Coco a été utilisée pour l'évaluation de l'efficacité symbiotique des isolats.

Matériel bactérien

Les souches de référence suivantes ont été utilisées : La souche CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) est utilisée comme témoin de l'efficacité symbiotique. Les souches SU 47 (*Rhizobium meliloti*) et PD 67 (*Agrobacterium tumefaciens*) sont employées pour leurs plasmides comme marqueur de taille. SU47 héberge deux plasmides de 1650 Kb et 1500 Kb (Burkardt & Burkardt, 1984, Burkardt *et al.*, 1987) et PD 67 héberge des plasmides de 267, 177, 117 et 35 MDa (Bromfield *et al.*, 1987).

Les souches ATCC10004^T (*R. leguminosarum* bv. *viciae*), R602 (*R. sp.*), CFN 42 (*R. etli* bv. *phaseoli*) et CFN 299 (*R. tropici*) sont employées pour des analyses RFLP.

Les isolats de la collection locale sont extraits des nodules (Vincent, 1970) des plantes de haricot cultivées sur des échantillons de sols prélevés de différents sites de deux régions de la Tunisie connues par la culture du haricot.

Milieux de culture

Les *Rhizobium* sont cultivés sur milieu YEM (Vincent, 1981) ou YEMA (YEM + agar 15 g/l et rouge congo 0,025 g/l) pour la propagation des cultures ou sur milieu TY (Beringer, 1974) ou HP (Hynes *et al.*, 1985) pour l'analyse des profils plasmidiques.

Les plantes de haricot sont cultivées sur milieu de Broughton et Dilworth (1971).

Test de nodulation

Le test de nodulation est effectué comme décrit par Beck *et al.*, 1993. Après huit semaines de culture, les plantes sont déracinées et examinées pour la nodulation.

Test de l'efficacité symbiotique

L'expérience est conduite dans des pots en plastique (une plante par pot) sur un support de gravier stérile. L'inoculation est effectuée avec 1 ml d'une suspension bactérienne de 10⁹/ml. Douze répétitions sont réalisées pour chaque isolat. Des témoins sont inclus dans l'essai.

Après huit semaines, les plantes sont récupérées et l'efficacité symbiotique est estimée par mesure du poids de matière sèche de la partie aérienne et par dosage de l'azote total selon la méthode de Kjeldahl. Les résultats sont soumis à une analyse de variance (système SAS).

Caractérisation des profils plasmidiques

La visualisation des plasmides a été effectuée selon la méthode d'Eckhardt (1978) modifiée par Hynes (Hynes *et al.*, 1985 ;1986) et Espuny *et al.* (1987).

L'électrophorèse est conduite pendant 30 min à 0,8 V/cm puis pendant 5 heures à 5 V/cm dans un tampon TBE. Chaque isolat de *Rhizobium* est testé dans quatre gels séparés.

Analyse RFLP

L'ADN bactérien total est extrait comme décrit (Laguerre *et al.*, 1992). Un échantillon d'ADN est digéré par l'enzyme de restriction et aux conditions appropriées. Le produit de digestion est soumis à l'électrophorèse en gel d'agarose à 0,9 % dans un tampon TAE (40 mM Tris, 4 mM Na acétate, 1mM EDTA, pH 7,9). Après transfert sur filtre de nitrocellulose (southern blot) l'ADN digéré est hybridé avec la sonde non radioactive marquée à la dUTP-Digoxigenine (Boehringer Mannheim, Allemagne) et la détection est effectuée selon les recommandations du fournisseur. Les sondes utilisées sont : p15b (gène *nifH*) et p42d-7 (gène *nodB*). Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est extrait du gel d'agarose sur papier DEAE-cellulose selon Sambrook *et al.* (1989).

RÉSULTATS

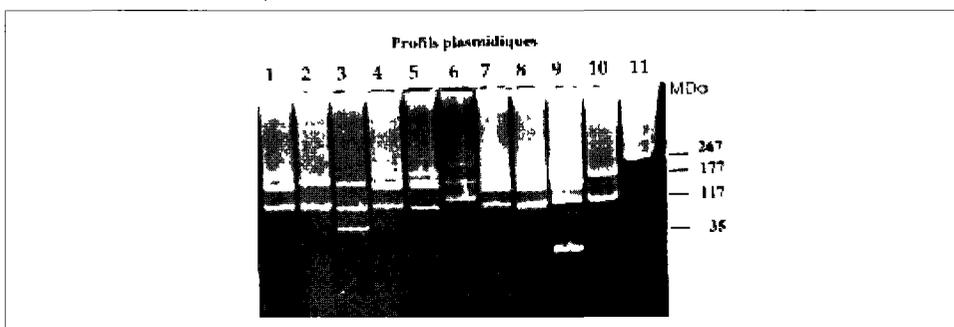
Constitution d'une collection locale de *Rhizobium* nodulant le haricot

Des prospections ont été menées dans deux régions connues par la culture du haricot au Nord-Ouest (Nord) et Nord-Est (Cap Bon) de la Tunisie. Des échantillons de sols ont été ramenés de trente neuf sites différents de ces régions. Deux variétés d'haricot (Coco et Royalnel) ont été cultivées sur ces sols et ont servi à l'isolement de *Rhizobium* à partir des nodules de ces plantes. Ainsi, une collection de 290 isolats a été établie. Ces isolats ont été authentifiés par la suite par leur aptitude à la nodulation dans des conditions bactériologiques contrôlées.

Caractérisation des profils plasmidiques

L'analyse des profils plasmidiques de 168 isolats de la collection locale de *Rhizobium* du haricot a été effectuée. Après électrophorèse en gel d'agarose, du lysat brut bactérien, des bandes ont été observées. À première vue, une hétérogénéité remarquable est notée (figure 1).

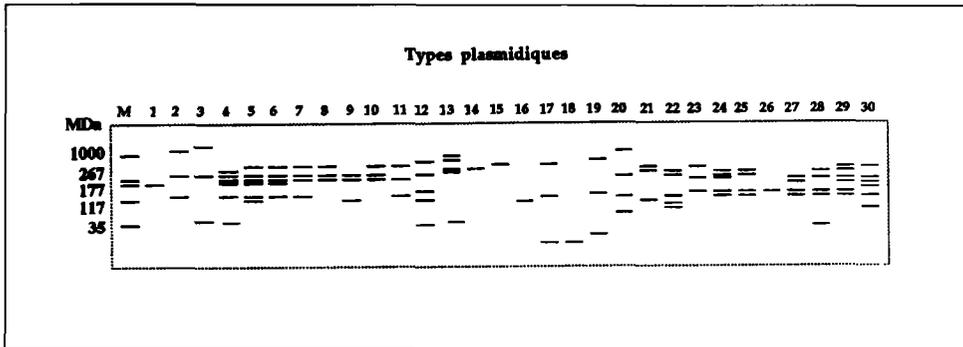
Figure 1. Exemple de profils plasmidiques de *Rhizobium* de haricot en Tunisie: Les profils ont été obtenus après électrophorèse en gel d'agarose 0,7% (voir matériels et méthodes).



1 à 11 différents isolats, les tailles indiquées sont celles des plasmides de la souche PD 67

La recherche de similarité totale entre profils plasmidiques a permis de faire des regroupements. Ainsi, 30 types plasmidiques ont été identifiés (figure 2).

Figure 2. Représentation schématique des différents types plasmidiques : Le regroupement des différents profils en types plasmidiques a été réalisé : chaque type plasmidique représente l'ensemble des profils entièrement identiques. 1 à 30 : différents types plasmidiques, M : marqueur de taille (plasmides des souches de référence PD67 et SU47).



Le nombre de bandes plasmidiques par profil varie de un à six. Le nombre le plus rencontré est de 3 plasmides (33 % des isolats) et le plus rare est de 1 plasmide (7 % des isolats). La taille des plasmides est variable, de moins de 35 MDa à plus de 1 000 MDa.

L'analyse de la distribution géographique des différents types plasmidiques a montré que chaque région est associée à des types plasmidiques distincts. Un seul type plasmidique s'est avéré commun aux régions du Cap Bon et du nord. Ce type majoritaire (25 % des isolats) s'est également montré identique à celui de la souche commerciale CIAT 899. En outre, les profils plasmidiques des isolats des différents sites ont montré des homologies partielles entre eux ainsi qu'avec celui de la souche commerciale CIAT899.

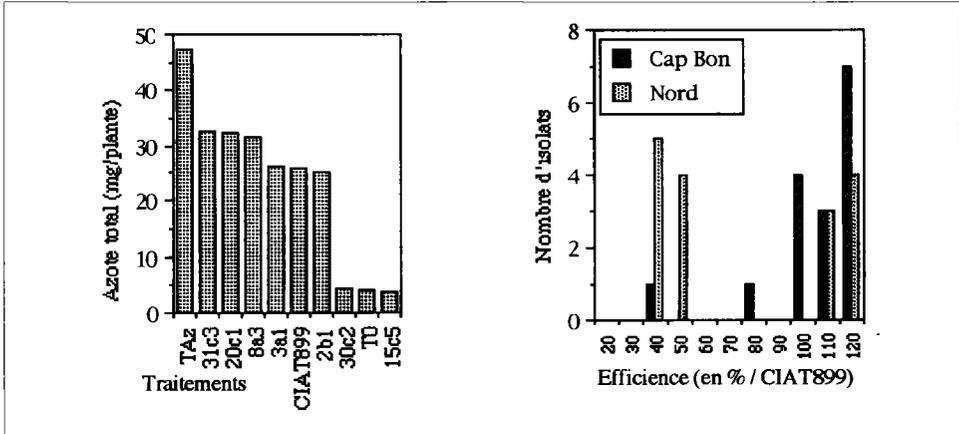
Évaluation de l'efficacité symbiotique des isolats

L'efficacité symbiotique, se traduisant par la capacité des *Rhizobium* de fixer l'azote atmosphérique en symbiose, a été évaluée par analyse de la croissance végétale en estimant le poids de matière sèche et l'azote total. L'étude a été menée sur 32 isolats représentatifs de la majorité des types plasmidiques.

L'analyse statistique de ces résultats (test de Duncan) a permis de classer les moyennes en trois groupes homogènes (efficaces, non efficaces et à efficacité intermédiaire).

L'efficacité la plus élevée est celle enregistrée par un isolat du Cap Bon, soit 120 % de la souche commerciale, ce qui représente un bon rendement, significativement supérieur à celui de CIAT 899.

L'analyse comparative de l'efficacité symbiotique des isolats des deux régions (nord et Cap Bon) a montré que ceux du Cap Bon sont significativement non différents de CIAT899, alors que ceux du nord se situent dans un groupement à efficacité symbiotique intermédiaire entre celle de CIAT 899 et celle du témoin négatif ne recevant pas d'inoculum (Figure 3).

Figure 3. Efficience symbiotique des isolats de *Rhizobium* du haricot en Tunisie.

a Rendement en azote de la partie aérienne de quelques isolats représentatifs des trois groupes d'efficience Taz : témoin azoté, TO : témoin non inoculé b Nombre d'isolats et pourcentage d'efficience, par rapport à la souche de référence CIAT 899, pour chacune des deux régions.

L'analyse des relations possibles entre efficience symbiotique et profils plasmidiques n'a permis d'établir aucune corrélation entre le type de profil, le nombre de plasmides ou leur taille globale et le degré d'efficience.

Analyse par RFLP

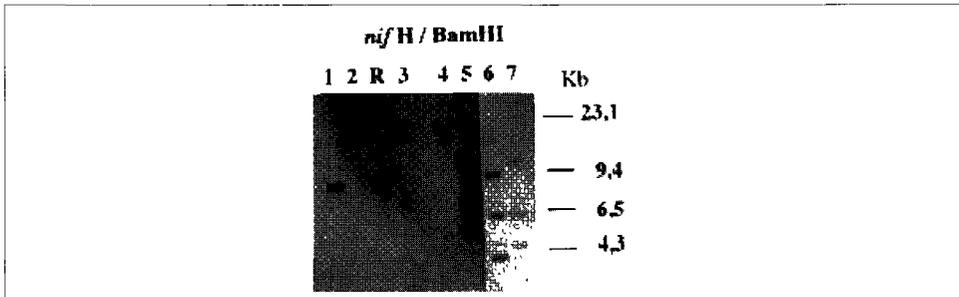
L'analyse du polymorphisme de la taille des fragments de restriction (RFLP) a été conduite sur 33 isolats locaux et 5 souches de références (CFN42, CFN299, R602, ATCC10004, CIAT899) représentant différentes espèces de *Rhizobium* nodulant le haricot.

L'analyse a été conduite avec deux sondes spécifiques des plasmides symbiotiques (*nifH* et *nodB*).

• Utilisation de la sonde *nifH*

L'hybridation avec la sonde *nifH* a permis de révéler 7 types de profils différents. Chaque type de profil est distinct des autres soit par le nombre des bandes ou leurs tailles. Un exemple de profils est montré sur la figure 4.

Figure 4. Analyse par RFLP en utilisant la sonde *nifH*. L'ADN génomique total des isolats de *Rhizobium* a été digéré avec l'enzyme de restriction BamHI, transféré sur filtre de nitrocellulose puis hybridé avec la sonde *nifH*.



Les tailles indiquées (en Kb) correspondent aux fragments de restriction de l'ADN du phage digéré par HindIII. 1 à 7 : différents isolats, R : souche de référence R602

Dix-neuf des 33 isolats testés présentent une seule copie du gène *nifH* (une seule bande est observée). Tous les types de profils de ces isolats sont différents de ceux des souches de référence CIAT 899 et CFN299 qui sont également caractérisées par la présence d'une copie unique du gène *nifH*.

L'examen des différents types de profils a permis de faire la subdivision en 4 sous-groupes (par la taille de la bande observée) : i) un 1^{er} sous-groupe est représenté par 4 isolats (3 originaires du nord et 1 du Cap Bon) qui possèdent la propriété de pousser sur milieu LB. Cette propriété les distingue de tous les autres isolats, ii) un 2^e sous-groupe est représenté par 8 isolats originaires du nord (2 isolats) et du Cap Bon (6 isolats). Le type de profil de ces isolats est identique à celui de la souche de référence R602, iii). Les deux derniers sous-groupes sont représentés par 1 et 6 isolats.

Des profils présentant trois copies du gènes *nifH* ont été également identifiés. Ces profils sont répartis en trois sous types de profils dont un profil identique à celui de la souche de référence *R. etli* CFN42. Onze isolats sont classés dans ce groupe.

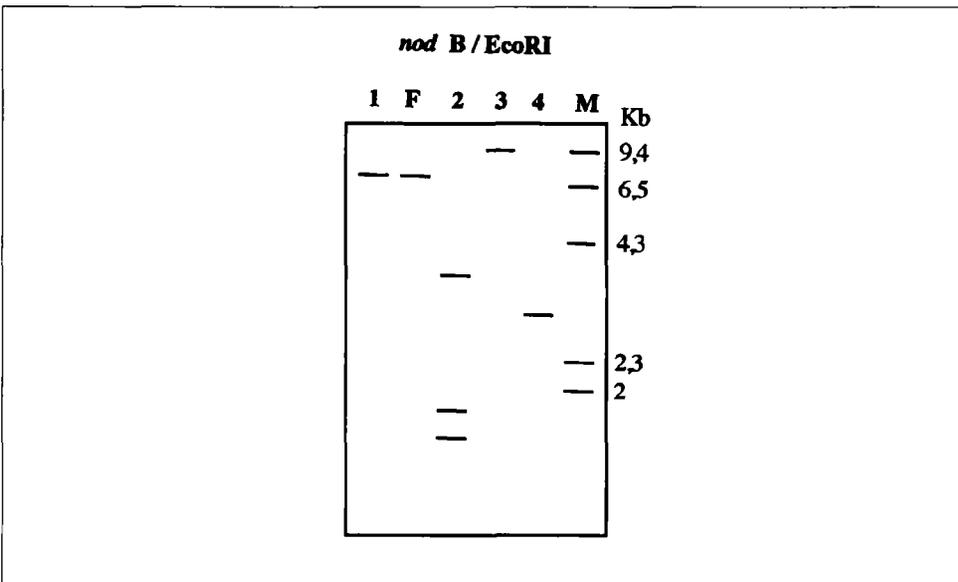
Trois des 33 isolats analysés n'ont pas répondu, à forte stringence, à la sonde *nifH* (« zéro » copie de *nifH*). Il s'agit d'isolats non efficaces.

• Utilisation de la sonde *nodB*

Le gène *nodB* semble être spécifique des espèces de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* et *Rhizobium etli* biovar *phaseoli*. L'utilisation du gène *nodB* comme sonde a permis de révéler, après hybridation avec l'ADN génomique total digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI*, 4 types de profils différents (fig. 5).

Seuls des isolats à trois copies de *nifH* donnent une réponse positive à forte stringence. Toutefois, un des 3 isolats à « zéro » bande *nifH* a répondu positivement à la sonde *nodB*.

Figure 5. Représentation schématique des différents types de profils obtenus de l'analyse par RFLP, de l'ADN génomique total des isolats de *Rhizobium* digéré par *EcoRI* en utilisant la sonde *nodB*.



1 à 4 : les 4 types de profils. M : marqueur de taille : les tailles indiquées (en Kb) correspondent aux fragments de restriction de l'ADN du phage digéré par *HindIII*. F : souche de référence CFN42

Les différents types de profils observés peuvent être classés (selon la taille ou le nombre des bandes) en quatre groupes distincts : i) Un premier groupe, présentant une seule bande, est représenté par 6 isolats. Le profil montré par ces isolats présente une homologie parfaite avec celui de la souche de référence de *Rhizobium etli* CFN42, ii) Deux autres groupes de profils à une seule bande sont représentés chacun par un seul isolat. Ces deux types sont différents de celui de CFN42, iii) Le dernier groupe est représenté par deux isolats dont le profil est caractérisé par la présence de 3 bandes.

• Utilisation de l'ADN génomique des souches de référence comme sonde

L'ADN génomique de chacune des 5 souches de référence (CIAT899, CFN42, ATCC10004, R602 et CFN299) a été utilisé comme sonde pour la recherche d'homologie entre les différents isolats et ces souches de références. Les résultats obtenus ne montrent aucun isolat local qui répond positivement à l'ADN génomique des souches CIAT 899 et CFN299. Treize isolats répondent, à forte stringence, à l'ADN génomique de la souche R602. Neuf isolats répondent positivement à la sonde correspondant à l'ADN génomique de la souche de référence ATCC10004 et 5 isolats donnent une réponse positive avec la souche CFN42. Six des 33 isolats testés ne répondent avec aucune des sondes employées.

Test de nodulation de *Leucaena leucocephala*

Certaines espèces de *Rhizobium* nodulant le haricot sont caractérisées par leur capacité de noduler la légumineuse tropicale *Leucaena leucocephala*. Il s'agit du groupe de *R. tropici*, ainsi que des deux espèces génomiques R602 et H152. En vue de tester la réponse de nos isolats locaux, préalablement caractérisés par RFLP pour ce caractère, ce test a été effectué.

Sur l'ensemble des 33 isolats testés, seulement 13 se sont avérés capables de noduler *Leucaena*. Tous les isolats nodulant *Leucaena* sont à une seule copie *nifH*. Tous les isolats ayant 3 copies de *nifH* ne nodulent pas *Leucaena*. Par ailleurs, il est à remarquer que tous les isolats nodulant *Leucaena* ont une efficacité symbiotique élevée sur le haricot, exception faite d'un seul isolat.

DISCUSSION

Une collection de 290 isolats locaux de *Rhizobium* nodulant le haricot a été constituée. L'évaluation de la diversité génétique par analyse de la composition plasmidique de 168 isolats a permis de dégager 30 types plasmidiques différents. Un seul type (majoritaire) s'est avéré commun aux deux régions prospectées.

L'analyse de l'efficacité de 32 isolats représentant la majorité des types plasmidiques a permis d'observer une variabilité remarquable ; d'une part, entre les isolats d'un même site ; d'autre part, entre les isolats du nord et les isolats du Cap Bon. Ainsi, la majorité des isolats du Cap Bon sont efficaces, alors que seulement 50 % des isolats du nord sont efficaces. Certains isolats voient leur efficacité dépasser celle de la souche commerciale CIAT 899.

La diversité observée, aussi bien au niveau des profils plasmidiques, qu'au niveau de l'efficacité, est en parfait accord avec les résultats décrites dans la littérature (Laguerre *et al.*, 1992 ; Harrison *et al.*, 1988 ; Mozo *et al.*, 1988).

L'analyse de la diversité génétique des isolats de cette collection, par RFLP, en utilisant des sondes plasmidiques a permis de tirer les conclusions suivantes : i) Un ensemble de 19 isolats présentent une seule copie du gène *nifH*. 13 de ces isolats sont capables de noduler la légumineuse tropicale *Leucaena leucocephala*. Ces isolats

constituent un groupe homogène. Ils sont répartis en 2 profils avec la sonde *nifH* dont un est identique à celui de la souche de référence R602. Par ailleurs, tous ces isolats sont regroupés dans les deux types plasmidiques 2 (majoritaire) et 20 qui possèdent 3 plasmides en commun et ne diffèrent que par une bande supplémentaire chez le type 20. En outre, ces isolats donnent une réponse négative avec la sonde *nodB*. Ils ne semblent pas donc appartenir aux espèces de *R. leguminosarum*, biovar *phaseoli* ni de *R. etli*, biovar *phaseoli*. Leur appartenance à l'espèce génomique R602, qui n'a été décrite que dans des sols français (Laguerre *et al.*, 1993), pourrait donc être suggérée.

ii) 10 des 33 isolats testés avec la sonde *nodB* répondant positivement. Tous ces isolats sont à 3 bandes *nifH*. Ils hybrident, à forte stringence, avec l'ADN génomique, de l'une ou l'autre des souches de référence CFN42 ou ATCC10004, utilisé comme sonde. Ces résultats laissent soupçonner leur appartenance aux espèces *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* ou *R. etli* biovar *phaseoli*.

En se basant sur les critères utilisés dans cette étude (RFLP avec les sondes plasmidiques *nifH* et *nodB*, le test de modulation de *Leucaena leucocephala*) ainsi que sur d'autres résultats (résistance à l'acide nalidixique, résistance à la streptomycine et la croissance à pH acide, croissance sur certains substrats carbonés) une partie des isolats de notre collection locale ne peuvent être classés dans les espèces génomiques déjà connues de *Rhizobium* nodulant le haricot (Amarger *et al.*, 1994, Jordan, 1984, Laguerre *et al.*, 1993, Martinez-Romero *et al.*, 1991, Segovia *et al.*, 1993).

L'analyse de la répartition géographique des différents isolats semble montrer que les isolats rapprochés à R602 sont originaires des deux régions prospectées. Au contraire, les isolats pouvant être considérés comme *R. etli* sont tous originaires de la région nord et à l'inverse les isolats classés comme *R. leguminosarum* sont tous originaires du Cap Bon.

Le reste des isolats non identifiés prennent leurs origines de l'une ou l'autre des régions.

Ces résultats montrent ainsi la grande diversité des populations locales de *Rhizobium* nodulant le haricot en Tunisie. La confirmation de ces résultats et une meilleure compréhension de l'appartenance des isolats locaux aux différentes espèces de *Rhizobium* nodulant le haricot nécessite certainement l'utilisation d'autres marqueurs, dont notamment la PCR, en utilisant comme sonde l'ADNr 16 S ou la séquence intergénique des ADN r 16S - ADNr 23 S.

Par ailleurs, ces résultats soulignent l'importance considérable qui réside dans la caractérisation et l'évaluation de cette population et ses retombées sur les programmes de développement de la culture du haricot.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de la Fondation Internationale pour la Science (Bourse de Recherche C/2237-1, M. MARS) et à l'AUPELF.UREF (Laboratoire Associé Francophone, LAF 310).

Nous remercions vivement les professeurs : - E.S.P. Bromfield (Canada) de nous avoir fourni les souches de référence SU47 et PD67, - N. AMARGER (INRA Dijon, France) de nous avoir fourni les souches de références CFN42, CFN292, les espèces génomiques R602 et H152 ainsi que les sondes comportant les gènes *nifH* et *nodB*, B.D. EARDLY (USA) pour les souches de références CFN42 et CFN299. Nos remerciements vont également au Prof. B. DREYFUS (ORSTOM, Sénégal) et le Service graines (Institut des Forêts, Tunisie) qui nous ont fourni les graines de *leucaena*.

Bibliographie

1. AMARGER N., BOURS M., REVOY F., ALLARD M. R., LAGUERRE G. (1994). *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. *Plant and soil*. **161**: 147-156.
2. BECK D.P., MATERON L.A., AFANDI F. (1993). Practical *Rhizobium*- Legume Technology Manual. I.C.A.R.D.A. Box 5466, Aleppo, SYRIA.
3. BERINGER J.E. (1974). R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.
4. BROMFIELD E.S.P., THURMAN N.P., WHITWILL S.T., BARRAN L.R. (1987). Plasmids and symbiotic effectiveness of representative phage types from two indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3457-3466.
5. BROUGHTON W.J., DILWORTH M.J. (1971). Control of leghemoglobin synthesis in snakebeans. *Biochem. J.* **125**: 1075-1080.
6. BURKARDT B., BURKARDT H.J. (1984). Visualization and exact molecular weight determination of a *Rhizobium meliloti* megaplasmid. *J. Mol. Biol.* **175**: 213-218.
7. BURKARDT B., SCHILLIK D., PUHLER A. (1987). Physical characterization of *R. meliloti* megaplasmids. *Plasmid* **17**: 13-25.
8. ECKHARDT T. (1978). A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584-588.
9. ESPUNY M.R., OLLERO F.J., BELLOGIN R.A., RUIZ-SAINT J.E., PEREZ-SILVA J. (1987). Transfer of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* symbiotic plasmid pRtr5a to a strain of *Rhizobium* sp. that nodulates on *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Bacteriol.* **63**: 13-20.
10. GENIAUX E., LAGUERRE G., AMARGER N. (1993). Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Ecol.* **2**: 295-302.
11. HARRISON S.P., JONES D.G., SCHUNMANN D.H.D., FORSTER J.W., YOUNG J.D.W. (1988). Variation in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* symbiotic plasmids and the association with effectiveness of nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2721-2730.
12. HYNES M.F., SIMON R., PUHLER A. (1985). The development of plasmid free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pAtC58. *Plasmid* **13**: 99-105.
13. HYNES M.F., SIMON R., MULLER P., NIEHANS K., LABES M., PUHLER A. (1986). The two megaplasmids of *R. meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 356-362.
14. JORDAN D.C. (1984) Family III. Rhizobiaceae. in : Krieg N.R., Holt J.G. (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, pp. 234-242. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
15. LAGUERRE G., GENIAUX E., MAZURIER S.I., CASARTELLI R.R., AMARGER N. (1993). Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii* and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can. J. Microbiol.* **39**: 412-419.
16. LAGUERRE G., MAZURIER S.I., AMARGER N. (1992). Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **107**: 17-26.
17. MARTINEZ E., FLORES M., BROM S., ROMERO D., DAVILA G. PALACIOS R. (1988). *Rhizobium phaseoli*: A molecular genetics view. *Plant and soil*. **108**: 179-184.
18. MARTINEZ E., PARDO M.A., PALACIOS R., CEVALLOS M.A. (1985). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity to *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1779-1786.
19. MARTINEZ-ROMERO E., SEGOVIA L., MERCANTE F.M., FRANCO A.A., GRAHAM P., PARDO M.A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 417-426.
20. MOZO T., CABRERA E., RUIZ-ARGUESO T. (1988). Diversity of plasmid profiles and conservation of symbiotic nitrogen fixation genes in newly isolated *Rhizobium* strains nodulating sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1262-1267.
21. MUTSCHLER M.A., BLISS F.A. (1981) Inheritance of bean seed globulin content and its relationship to protein content and quality. *Crop Science* **21**: 289-295.
22. PRAKASCH R.K., ATHERLY A.G. (1986). Plasmids of *Rhizobium*, their role in symbiotic nitrogen fixation (review). *Int. Rev. Cytol.* **104**: 1-24.

23. QUINTO C., DE LA VEGA H., FLORES M., FERNANDEZ L., BALLADO T., SOBERON-CHAVEZ G., PALACIOS R. (1982). Reiteration of nitrogen fixation genes sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature (London)* **299**: 724-726.
24. SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, N.Y.
25. SEGOVIA L., YOUNG J.P.W., MARTINEZ-ROMERO E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains in a new species, *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 374-377.
26. VINCENT J.M. (1970). *A Manual for the Practical Study of the Root nodule Bacteria*. IBP handbook No. 15. Blakwell, Oxford.
27. VINCENT J.M. (1981). The genus *Rhizobium*. In the *Procaryotes* Vol. I. Academic Press.

D8 : La détection des sérotypes de deux potyvirus des légumineuses (CABMV et B1CMV) dans des plantes adventices au Togo

**ATISSIME K.¹ et Y.E., DIBAHOMA S.¹, GUMEDZOE M.Y.D.¹,
AKPAGANA K.²**

Université du Bénin. (1) École Supérieure d'Agronomie. Laboratoire de Virologie Végétale. (2) Faculté des Sciences, Département de Botanique, B.P. 1515 Lomé, Togo, Fax (228) 218595.

INTRODUCTION

Le niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp.), légumineuse à graine est confrontée sous les tropiques à plusieurs contraintes parmi lesquelles les maladies virales occupent une place de choix. Parmi ces dernières, celles causées par le virus de la mosaïque niébé transmis par pucerons (CABMV) et celui de la mosaïque du niébé à yeux noirs (BICMV) entraînent souvent des pertes considérables de rendement (30 à 87 % et parfois plus) (1,2). Plusieurs travaux font état également de l'existence du BICMV et du CABMV sur des espèces végétales spontanées, généralement dans des plantes adventices diverses qui joueraient un rôle important dans la distribution et le déclenchement des épidémies virales dans les cultures de niébé (1,3.).

Les deux Potyvirus (BICMV et CABMV) ont été identifiés au Togo (3, 4) mais leurs sérotypes n'ont pas encore été déterminés, de plus, leurs réservoirs dans la nature ne sont pas connus. Nous avons donc décidé de procéder à l'inventaire des sérotypes des deux virus dans les plantes adventices couramment rencontrées dans les cultures du niébé au Togo (Figure 1). Les résultats obtenus font l'objet du présent article.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

• Le matériel végétal

Les graines de la plupart des plantes tests ainsi que celles des variétés de niébé utilisées ont été fournies par l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA ; IBADAN, NIGERIA). Les graines sont semées dans des pots en plastique de 8,5 cm x 10 cm remplis de terreau stérilisé. Après le semis, les pots sont gardés dans des cages grillagées, à l'abri des insectes, jusqu'à l'obtention de jeunes plants prêts à être inoculés. Les plantes tests utilisées sont : *Nicotiana benthamiana*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. tabacum Samsun*, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

LES ANTICORPS UTILISÉS

Nous avons utilisé :

- un anticorps monoclonal universel pour la détection des virus du groupe des Potyvirus (anticorps commercialisé par Agdia Inc. USA) ;

- deux anticorps polyclonaux Ab^rH₃ (à la concentration 1mg/ml) et Ab^rH₄ (à la concentration plaques 2mg/ml) pour la détection du BICMV et du CABMV ;
- les anticorps monoclonaux 16G5 et 15E6 couplés au 10G5 Biot. permettant la détection respectivement des sérotypes A, et B du BICMV. Les sérotypes C, D, E F et G du CABMV ont été identifiés en utilisant respectivement les couples d'anticorps (IF5-IF5 Biot ; 5H5-7D9 Biot ; 12F9-6C10 Biot et 5H5-5H5 Biot).(5,6)

MÉTHODES

La collecte des échantillons

Les feuilles des plantes virosées ou non ont été récoltées dans diverses localités des Préfectures d'Amou, de l'Ave, de Danyi, du Golfe, de Kloto, de Tchaoudjo, de Tone, et du Zio (Figure 1). Nous avons aussi récolté des graines de certaines de ces adventices que nous avons utilisées lors des tests biologiques. Les échantillons sont conservés au froid dans une glacière jusqu'au laboratoire où ils sont gardés au congélateur jusqu'à leur utilisation pour les inoculations et pour les tests sérologiques.

Identification des sérotypes du BICMV et du CABMV

L'identification du BICMV, du CABMV et leurs sérotypes a été réalisée par la méthode immuno-enzymatique ELISA en utilisant soit des anticorps polyclonaux (produits par l'IITA), soit des anticorps monoclonaux (produits à la station de Recherche de l'Agriculture Canada à Vancouver) soit une association des deux types d'anticorps. Les différentes étapes de cette technique et leurs conditions de réalisation ont été précédemment décrites dans d'autres publications (5,6).

Symptomatologie sur des plantes indicatrices et évaluation de cultivars de niébé à l'égard des isolats 23-27 et 12-496/94 du CABMV.

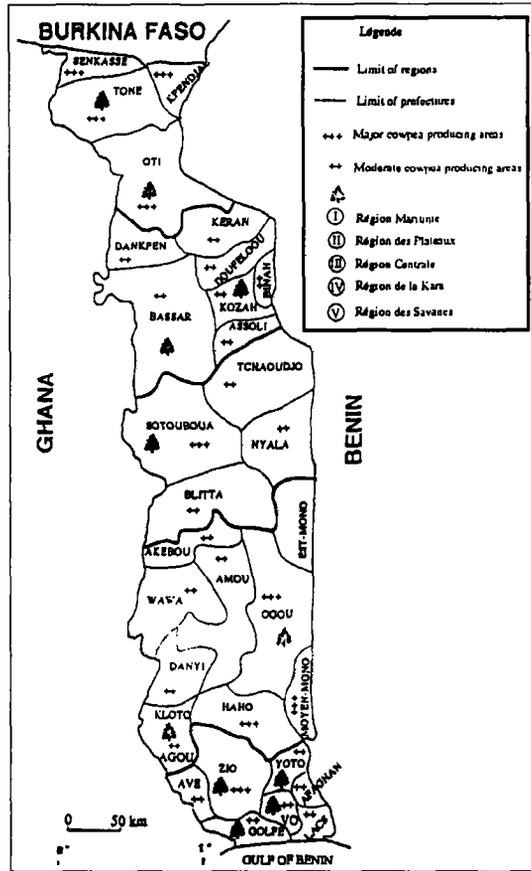
Nous avons procédé à l'inoculation mécanique de 31 et 21 cultivars de niébé respectivement avec les isolats clonés 23-27 et 12-496/94 du CABMV tous deux appartenant au sérotype C.

L'isolat 23-27 a été prélevé sur du haricot vert à Sotouboua-Ville ; l'isolat 12-496/94 a été récolté à la ferme agro-pédagogique de l'Ecole Supérieure d'Agronomie (ESA) à Lomé sur une plante adventice très commune au Togo, *Pupalia lappaceae* (**Amaranthaceae**). Les plants inoculés et les témoins sont gardés séparément dans différentes cages grillagées à l'abri des insectes pendant 4 à 6 semaines.

Les critères d'évaluation ont porté sur la présence ou l'absence de symptôme, le nombre de plants infectés et la croissance des plants, suivant une échelle de 1 à 5 : (1 : pas de symptôme visible ; 5 : mosaïque très sévère suivie d'un retard de croissance avec 75 à 100 % des plants infectés).

Les plants ne présentant pas de symptôme de virose (note 1) et vérifiés par le test ELISA et par inoculation mécanique à des niébés sensibles, sont déclarés résistants si les deux tests sont négatifs.

Figure 1. Carte du Togo indiquant les zones de production majeures (+++) et moyennes (++) du niébé et les localités où les deux Potyvirus (CABMV et BICMV) ont été identifiés.



RÉSULTATS

Principaux sérotypes du CABMV et du BICMV détectés dans les plantes adventices

Parmi les 185 échantillons collectés (plantes adventices et niébé) et soumis au test ELISA (DAS-ELISA et ACP-ELISA), 102 ont réagi positivement à l'égard de l'antisérum universel des Potyvirus parmi lesquels 40 et 68 étaient identifiés respectivement comme étant du CABMV et du BICMV.

Les sérotypes des deux virus se répartissent de la façon suivante : sérotype A (46), sérotype B (28), sérotype C (32), sérotype D (9), sérotype E (5) sérotype F (3), sérotype G (2). Le sérotype A est celui qui est le plus fréquemment retrouvé dans les échantillons collectés, suivi du sérotype C et enfin du sérotype B. Les sérotypes identifiés étaient souvent retrouvés en mélange. Les principaux sérotypes des deux virus (BICMV et CABMV) détectés dans les adventices sont repris au **Tableau 1**. En particulier l'espèce *Pupalia lappaceae* est une plante réservoir pour les deux virus, et la plupart de leurs sérotypes ont été identifiés chez cette espèce.

Les sérotypes du BICMV et du CABMV ont été également détectés dans les feuilles de *Acanthospermum hispidum*. Ces plantes adventices constituent donc des réservoirs pour ces deux Potyvirus et/ou probablement pour leurs vecteurs dans les cultures de niébé. Ces Potyvirus sont signalés pour la première fois au Togo sur ces adventices.

Symptomatologie sur les plantes indicatrices

Parmi les isolats viraux du CABMV, nous en avons sélectionné deux, 23-27 et 12-496/94 qui appartiennent au **sérotype C**. Ils ont été clonés (par transferts successifs de lésions locales) et ils ont servi pour les études sur la gamme différentielle de plantes hôtes et au criblage des cultivars de niébé.

L'inoculation de jeunes plants de *Pupalia lappacea* avec l'isolat 12-496/94 (sérotype C provenant de cette même plante) a induit des symptômes de mosaïque chez ceux-ci. Cet isolat a également infecté des cultivars de niébé suivants : Ife Brown, VITOCO et KN1. Ce même isolat viral a infecté d'autres cultivars de niébé lorsqu'il est inoculé artificiellement à ceux-ci. Les symptômes induits par l'isolat 23-27 du CABMV sur une gamme de plantes indicatrices (**Tableau 2**) révèlent que *Nicotiana glutinosa* et *N. rustica* ne sont pas infectés par le CABMV. Les cultivars de niébé sensibles produisent des symptômes de mosaïque légère à sévère avec rabougrissement des plants et présence de liseré des nervures (*veinbanding*) sur certaines feuilles.

Tableau 1 : Lise des espèces végétales sur lesquelles du CABMV et du BICMV et leurs sérotypes ont été identifiés.

Espèces végétales	Familles végétales	Utilités	Virus et sérotypes identifiés
<i>Pupalia lappacea</i>	Amaranthaceae	Médicinales	CABMV (C, D, E, F, et G) BICMV (B)
<i>Cassia occidentalis</i>	Caesalpiniaceae	Médicinales	BICMV (A et B)
<i>Passiflora foetida</i>	Passifloraceae	Fruits comestibles	CABMV (C et D)
<i>Desmodium tortuosum</i>	Fabaceae	Fourragères	CABMV (C et D)
<i>Acanthospermum hispidum</i>	Compositae	Médicinales	CAMV (F et G) BICMV (B)
<i>Abutilon mauritianum</i>	Malvaceae	Médicinales	CABMV (C et E)
<i>Centrosema pubescens</i>	Fabaceae	Fourragères	CABMV (C, F et G)
<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	Feuilles et graines comestibles	CABMV (C à G) BICMV (A et B)

Figure 2 : Photographie d'un plant virosé (infection naturelle) de *Pupallia lappaceae* (Amaranthaceae)



Évaluation de cultivars de niébé

L'évaluation de 31 cultivars de niébé avec l'isolat 23-27 du CABMV (sérotypage C) révèle (**Tableau 3**) que 18 cultivars sont sensibles au CABMV (soit 52 % des cultivars). Les cultivars résistants ou tolérants sont au nombre de 13 (soit 48 %).

Le cultivar 58-146 largement diffusé dans les régions productrices de cette légumineuse au Togo est très sensible à ce sérotypage du CABMV. Par contre les cultivars VITOCO et TvX1850-01E en voie de vulgarisation sont résistants à ce sérotypage C du CABMV. L'évaluation de 21 cultivars de niébé avec l'isolat 12-496/94 a indiqué que les cultivars de niébé sont aussi résistants à ce sérotypage.

Tableau 2 : Réactions induites par l'isolat 23-27 du CABMV (sérotypage C) sur quelques plantes tests.

Plantes tests	nombre de plants inoculés	Nombre de plants infectés	Symptômes
<i>Nicotiana rustica</i>	15	0	-
<i>Nicotiana benthamiana</i>	15	13	Mild Mo
<i>Nicotiana tabacum</i> cv Samsun	15	5	NLL
<i>Nicotiana glutinosa</i>	15	0	-
<i>Vigna unguiculata</i>			
- cvs Tvu 3629 (Ife Brown)			
- cv TVX3671-14C-01D	30	21	STN, Sev.Mo
- cv Vita 7	20	8	Sev.Mo
- cv Locale Blanche	20	15	Vb, Sev.Mo
	15	5	Sev.Mo

Signification des symboles : - : pas de symptôme ; Mild mo . mosaïque faible ; NLL : lésions locales nécrotiques .
STN : nanisme ; Sev.Mo : mosaïque sévère ; Vb : liseré des nervures

Tableau 3 : Réactions de trente-et-un cultivars de niébé à l'égard de l'isolat 23-27 du CABMV (sérotipe C).

Cultivars de niébé	Nombre de plants inoculés	Nombre de plants infectés	Lésions Réact. locales systémiques	Notes
1- IT83S-818	9	0	- -	1
2- IT86D-1056	8	4	LL Mo	3
3- IT82E-18	10	0	- -	1
4- IT82E-885	10	0	- -	1
5- IT82E-16	11	0	- -	1
6- IT81D-889	6	0	- -	1
7- IT82D-786	14	1	NLL Mo	2
8- IT81D-1007	5	0	- -	1
9- IT84E-124	8	4	- Mo	3
10-IT85F-2505	6	0	- -	1
11- IT82E-32	6	0	- -	1
12- IT84S- 2246-4	5	0	- -	1
13- IT82D-703	8	7	- Vb, Sev.Mo	5
14- IT82D-889	8	0	- -	1
15- IT84E-108	10	8	- Sev.Mo, Vb	5
16- TVX3236- 01G	6	4	- Mo	4
17- TVX3671- 14C-01D	5	3	- Sev.Mo	5
18- TVX1193-9F	13	2	NLL Mo	2
19- TVX1850- 01E	14	0	- -	1
20- TVu410	5	0	- -	1
21- TVu19	8	0	- -	1
22- TVu3629	13	12	- STN, Sev.Mo	5
23- KNI	12	4	LL Mo	3
24- DIAPAGA	7	2	LL Mo, STN	3
25- LOCALE BLANCHE	7	4	- sev.Mo	4
26- VITA 5	5	2	CLL -	3
27- VITOCO	12	0	- -	1
28- VITA 7	10	10	- Vb, Sev.Mo	5
29- AFAGNAGAN	7	4	- Vb	4
30- 58-146	12	12	- Sev.Mo	5
31- LOC. GLEI	6	3	LL Mo	3

LL : lésions locales ; NLL : lésions locales nécrotiques ; CLL : lésions chlorotiques . Vb : liseré des nervures . Mo : mosaïque ; Sev.Mo : mosaïque sévère ; STN : nanisme.

DISCUSSION

Les mauvaises herbes constituent souvent une source non négligeable de dissémination des virus. Ainsi il a été signalé la présence du BICMV et du CABMV dans différentes plantes sauvages (1, 3). Nos résultats prouvent aussi l'importance des espèces suivantes : *Pupalia lappaceae*, *Cassia occidentalis*, *Passiflora foetida*, *Desmodium tortuosum*, *Acanthospermum hispidum*, *Abutilon mauritianum*, *Centrosema pubescens* dans le déclenchement des épidémies virales causées par BICMV et CABMV dans les cultures de niébé. Parmi les sérotypes identifiés des deux Potyvirus, le sérotipe A du BICMV semble être le plus fréquent. Ce dernier est le plus souvent détecté dans les échantillons de plantes adventices et dans ceux du niébé. Les sérotypes des deux virus sont souvent retrouvés en mélange dans les infections

mixtes, probablement ceci serait à la base des difficultés rencontrées par différents auteurs pour séparer les deux virus (7, 8). Les résultats obtenus indiquent que le BICMV est très répandu tant dans les zones majeures que mineures de production du niébé au Togo.

L'infection du *Centrosema pubescens* par BICMV ou CABMV a été également signalée dans d'autres pays (1, 3). De même, la présence de particules du CABMV dans des échantillons foliaires de *Nauclea latifolia*, une autre espèce végétale très importante de la médecine traditionnelle africaine (3) a été rapportée. Compte tenu des résultats ainsi obtenus, il serait indiqué d'intensifier et de poursuivre les travaux d'identification de ces virus tant dans les plantes adventices que dans les cultures de niébé en vue de mieux comprendre la dynamique du déclenchement des épidémies virales dans les cultures de cette légumineuse, de rechercher et de développer des variétés résistantes du niébé à l'égard de ces virus et de leurs sérotypes les plus virulents.

Remerciements

Le premier auteur exprime sa profonde gratitude à la Fondation Internationale pour la Science (IFS), Stockholm, Suède, pour son appui financier à travers la bourse de recherche C/1143-2 qui lui a été octroyée. Les auteurs adressent également leurs sincères remerciements aux autorités de l'Université du Bénin et à l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA, IBADAN, NIGERIA) pour les ressources financières et matérielles mises à leur disposition pour la réalisation de ces travaux de recherches.

Bibliographie

1. BEHNCKEN G.M., MALOEVSKY L. Detection of cowpea aphid-borne mosaic virus in Queensland. Australian J. of Exp. Agriculture and Animal Husbandry 1977 ; 17 : 674-678.
2. CHANG C.A., KUO, COWPEA Y.J. aphid-borne mosaic virus and its effects on the yield and quality of asparagus bean. J. Agric. Res. China (Taiwan) 1983 ; 32 : 270-278.
3. GUMEDZOE M.Y.D. Major virus diseases of medicinal plants in West Africa Acta Horticulturae 1993 ; 331 : 307-310. Ann. appl. Biology 1981 ; 99 : 195 - 209.
4. GUMEDZOE, M.Y., SUNU, D.Y., THOTTAPPILLY G., ASSELIN A. Importance du virus de la marbrure du niébé et du virus de la mosaïque jaune du niébé au Togo. Phytoprotection 1990 ; 85-91.
5. HUGUENOT C., FARNEAU M.T., THOTTAPPILLY G., ROSSEL H.W., HAMILTON R.I. Evidence that cowpea aphid-borne mosaic and blackeye mosaic are deux different Potyviruses. J. Gen Virol. 1993 ; 74 : 335-340.
6. THOTTAPPILLY G. *et al.* Identification of cowpea viruses and their strains in tropical Africa- an International Pilot project. FAO Plant Prot Bull 1993 ; volume 41/2, p 65-72.
7. DIJKSTRA J., BOS L., BOUWMEESTER H.J., HADIASTONO T., LOHUIS H. Identification of blackeye cowpea mosaic virus from germplasm of yard-long-bean and from soyabean, and the relationships between blackeye cowpea mosaic virus and cowpea aphid-borne mosaic virus. Neth. J. Plant Path. 1987 ; 93 : 115-133.
8. TAIWO M.A., GONSALVES D., PROVIDENTI R., THURSTON H.D. Partial characterization and grouping of isolates of blackeye cowpea mosaic and cowpea aphid-borne mosaic viruses. Phytopathology 1993 ; 72 : 590-596.

D9 : Utilisation des marqueurs génétiques pour l'identification et l'évaluation de la diversité génétique de l'Olivier (*Olea europaea* L.)

OUAZZANI N.¹, LUMARET R.², VILLEMUR P.³

¹ Département d'Arboriculture, Unité de Génétique, École Nationale d'Agriculture, B.P. S.40, Meknès, Maroc. ² Département de Biologie des populations, CEFE-CNRS, Montpellier, France. ³ Laboratoire d'Arboriculture, INRA-ENSA, Montpellier, France

INTRODUCTION

Pour une majorité du grand public, la conservation des ressources génétiques consiste avant tout en la protection d'espèces menacées de disparition. Si cette préoccupation est légitime, il convient de ne pas mésestimer l'intérêt pour des espèces non menacées, de conserver chez elles l'essentiel de leur variabilité génétique naturelle garante d'une meilleure adaptation. Dans ce contexte, l'exploitation rationnelle de cette diversité pour la conservation et la valorisation suppose une bonne connaissance de la diversité génétique disponible aussi bien chez les formes cultivées, que chez les formes sauvages apparentées susceptibles d'être des sources de diversité exploitable. Ceci est particulièrement important pour une espèce comme l'Olivier (*Olea europaea* L.) pour laquelle on compte plus d'une centaine de variétés inféodées souvent à une région donnée, dans chacun des principaux pays oléicoles du Bassin Méditerranéen (Tous et al. 1990, Rugini et Lavee 1992). Les plus anciennes résulteraient de croisements naturels et successifs entre les variétés ancestrales et/ou les formes spontanées ou sous-spontanées locales (Zohary et al. 1975). Les variétés d'Olivier présentent une variabilité morphologique importante pour la taille du fruit et de la feuille ainsi que la teneur en huile (Ruby 1918, Rugini et Lavee 1992), de sorte que la caractérisation reste encore mal définie pour de nombreuses variétés, à l'exception de celles étudiées dans des collections avec des clones similaires (Scaramuzzi et Roselli 1986, Caballerro et al. 1990). En outre, un nombre important de variétés sont considérées comme « variété population » car elles renferment de nombreux types ou clones présentant des différences morphologiques et/ou agronomiques, plus au moins importantes (Morettini 1972). Par exemple dans le cas du Maroc, par l'absence d'études systématiques du patrimoine oléicole, l'assortiment variétal marocain est communément considéré comme étant limité à une seule "variété population" dénommée « Picholine marocaine » (Ouazzani et al. 1996). Par ailleurs, aucune information précise n'existe sur la variabilité génétique intra et interpopulations (ou peuplements) sur l'origine des variétés cultivées, ainsi que sur les relations phylogénétiques qui peuvent exister entre les différentes espèces ou sous-espèces apparentées à l'*Olea europaea*, qui ont probablement contribué à l'évolution de la culture de l'Olivier, comme en témoigne certaines études paléontologiques (Green et Wickens 1989, Zohary et Hopf 1993). Compte tenu de l'ensemble de cette situation et afin de contribuer à la connaissance de la diversité génétique de l'Olivier, notre travail s'est basé sur l'utilisation des marqueurs génétiques, notamment enzymatiques (marqueurs nucléaires codominants) et depuis peu moléculaires (variation de l'ADN

chloroplastique par exemple). Les marqueurs enzymatiques sont largement utilisés pour l'identification variétale et l'étude de la distribution spatiale de la diversité génétique. En outre, les relations phylogénétiques entre l'Olivier et les autres espèces apparentées sont également étudiées par le polymorphisme de la variation de l'ADN chloroplastique (ADNcp). Nous abordons dans cette communication l'état de nos travaux, notamment le point sur les marqueurs enzymatiques, à travers une synthèse des résultats obtenus sur les principales variétés méditerranéennes et les peuplements de l'Olivier cultivé au Maroc où l'extrême variabilité des conditions écologiques et l'histoire de la culture de l'Olivier constituent un matériel de choix pour cette étude.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Pour l'identification variétale, le matériel végétal utilisé est constitué de 47 variétés, les plus couramment utilisées, originaires des principaux pays producteurs et représentent une large distribution de l'Olivier dans le Bassin Méditerranéen. Pour l'évaluation de la diversité génétique de l'Olivier cultivé au Maroc et afin d'obtenir le meilleur reflet possible de la diversité génétique existante, notre étude a porté exclusivement sur les anciens peuplements traditionnels. Dix peuplements représentatifs des principales aires écologiques de l'Olivier au Maroc, ont été échantillonnés selon un transect nord-sud allant du Pré-Rif à l'Anti-Atlas ; soit quatre peuplements dans la région nord (Chefchaouen, Ouazzane, Moulay-Idriss, Meknès), deux dans le centre (Marrakech, Amizmiz) et quatre dans la région sud (Imouzer, Taroudant, Tazmourt, Igherm). La stratégie d'échantillonnage a été basée sur des observations sur le terrain et des enquêtes auprès des agriculteurs. Pour chaque peuplement et en fonction de l'importance de la variabilité observée, 30 à 40 individus ont été repérés et marqués afin d'effectuer ultérieurement les observations, les prélèvements et les analyses. Pour l'Olivier sauvage, l'étude a été réalisée (et en cours) sur diverses populations d'oléastres et sous-espèces apparentées à *Olea europaea*, échantillonnés dans différentes régions du Bassin Méditerranéen.

Analyse génétique

L'ensemble des variétés et individus a été analysé par électrophorèse enzymatique sur gel d'amidon à partir d'extraits protéiques des feuilles. Les techniques d'extraction des protéines à partir des feuilles fraîches, de migration et de révélation des enzymes, et le déterminisme génétique des systèmes enzymatiques utilisés sont celles décrites par Ouazzani et al. (1993). L'analyse a porté sur 9 loci polymorphes sur les 11 loci étudiés : des leucine aminopeptidases, E.C.3.4.11.1. (locus LAP1), des estérases, E.C.3.1.1.2. (loci EST1 et EST2), des alcool déshydrogénases, E.C.1.1.1.1. (locus ADH1), des malate déshydrogénases, E.C.1.1.1.37. (locus MDH2), des phosphoglucose isomérases, E.C.5.3.1.9. (PGI1-2, loci dupliqués présentant les mêmes allèles), des phosphoglucomutases, E.C.5.3.1.9. (locus PGM2), et des peroxydases, E.C.1.11.1.7. (locus PX1). Les loci PGM1 et MDH1, sont monomorphes dans nos conditions expérimentales.

Analyse des données

Les génotypes décrits aux 9 loci étudiés ont été regroupés en génotype multiloci pour l'identification de chaque variété ou individu. La matrice de distance du Chi-2 pondérée (Benzecri 1973) est utilisée pour la classification ascendante hiérarchique (CAH) des variétés étudiées.

L'évaluation de la diversité génétique de l'Olivier au Maroc est illustrée par le nombre de génotypes multiloci observés et le degré d'hétérogénéité intra-peuplement estimé par l'indice de diversité génotypique relative « DG » proposé par Pielou (1969) :

$$DG = 1 - \sum [ni(ni-1) / N(N-1)]$$

Où ni est le nombre d'individus avec le génotype i et N est le nombre total d'individus analysés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Identification variétale

La discrimination entre les variétés analysées, est basée sur leurs génotypes observés aux 9 loci étudiés. Trente-huit génotypes multiloci différents ont été observés pour les 47 variétés analysées. Ces 38 génotypes ont permis l'identification de 35 variétés, ce qui donne un pourcentage d'indétermination de 25 %, avec une discrimination plus importante pour les systèmes enzymatiques PGI, EST, LAP, MDH (Ouazzani et al. 1995). La classification ascendante hiérarchique (CAH) des 38 génotypes multiloci observés a mis en évidence 6 groupes de variétés. Dans la plupart des groupes, les variétés possèdent des origines géographiques diversifiées. Seul un groupe, composé uniquement de variétés originaires de France, fait exception. Ce résultat peut s'expliquer par les diverses migrations humaines qui ont favorisé la dispersion de l'olivier cultivé depuis la plus haute antiquité sur l'ensemble du pourtour de la Méditerranée (Chevalier 1948, Ciferri 1950). Par ailleurs, les 10 des 11 variétés originaires d'Afrique du Nord ont été observées dans un même groupe avec une forte ressemblance génotypique entre certaines de ces variétés (variétés Sigoise, Picholine marocaine, et Bouchouika) (Ouazzani et al. 1995). Ce résultat laisse supposer une différenciation commune et originale d'une partie des variétés de cette région comme l'ont suggéré Chevalier (1948) et Ciferri (1950). Par ailleurs, on remarque que la majorité des variétés diffère par l'identité des allèles seulement à 1 ou 2 loci. Cette ressemblance génotypique laisse supposer que la plupart des variétés d'olivier, notamment les plus anciennes, auraient une origine commune et présenteraient, quelle que soit l'origine géographique de la variété, une forte proportion d'ancêtres communs. Cette hypothèse a été confirmée par les premiers résultats de l'analyse de la variation de l'ADNcp qui a montré que 95 % des variétés analysées ont le même chlorotype. Signalons que l'hérédité maternelle de ce marqueur moléculaire cytoplasmique a été vérifiée en analysant la descendance F1 d'un croisement contrôlé (Lumaret et al., en préparation).

Évaluation de la diversité génétique de l'olivier au Maroc

L'identification génétique du matériel prospecté au Maroc a permis de définir 68 génotypes multiloci différents sur les 328 individus analysés. La classification de ces individus sur la base de leur génotype multiloci a mis en évidence 4 groupes dont un regroupe les génotypes des principales variétés traditionnelles (tableau 1) les plus connues et répandues au Maroc (Picholine, Dahbia, Meslala, Bouchouika, Hamrani). Les génotypes des autres groupes sont à 72 % « locaux » (propres à une région géographique ou peuplement) ; nord, centre, ou sud) et rares (observés au plus 2 fois). Sur les 68 génotypes mis en évidence, 59 génotypes sont propres au Maroc, en comparaison avec les génotypes multiloci des variétés méditerranéennes analysées (Ouazzani et al. 1993 et 1994). La présence de ces 9 génotypes pourrait correspondre à des traces d'introduction d'Olivier cultivé au Maroc, au gré de pratiques commerciales et/ou lors des diverses migrations humaines. Le nombre de génotypes par peuplement

varie entre 2 et 22 avec une valeur moyenne de 10,7 (tableau 2). La comparaison des peuplements des 3 régions géographiques du nord (peuplements 1 à 4), du centre (peuplements 5 et 6), et du sud (peuplements 7 à 10) (tableau 2) montre que le nombre de géotypes augmente en allant du nord au sud du Maroc. Il passe de 22 pour le Nord, à 29 pour le Centre et 39 pour le Sud. La diversité génotypique moyenne (DG) intra-peuplement est de 0,63 (minimum 0,07 ; maximum 0,93) (Tableau II). Une analyse comparative par région (Tableau II), montre que la DG augmente du nord au sud de 72 % (nord DG=0,50 ; centre DG=0,74 ; sud DG=0,86), dans le même sens que le nombre de géotypes. Analysée sur l'ensemble des peuplements, la décomposition de la diversité génotypique se répartit ainsi : DG (intra) : 0,63 ; DG totale : 0,72 ; DG (inter) : 0,09. La composante intra-peuplement contribue donc à la majeure partie (87,5 %) de la diversité totale observée.

Tableau 1 : Géotypes multiloci de 7 variétés marocaines d'olivier cultivées au Maroc, pour 9 loci analysés.

Variétés	Locus							
	LAP1	EST1	EST2	ADH1	MDH2	PGII-2	PGM2	PX1
Picholine (a)	33	11	12	22	12	1112	11	22
Dahbia	33	11	22	22	12	1112	11	22
Bouchouika	33	11	12	22	22	1112	11	22
Meslala	33	11	22	22	22	1112	11	22
Hamrani	33	11	12	12	12	1112	12	22

(a) *Haouzia* et *Menara* ont le même géotype que le type *Picholine marocaine* dénommé « Zit » ou « Zitoun » par les agriculteurs.

Tableau 2 : Diversité génotypique (DG) intrapeuplement chez 10 peuplements d'olivier cultivés au Maroc.

Peuplement et région géographique (1)	Nb de géotypes multiloci	DG (2)
1. Chefchaouen	8	0.59
2. Ouazzane	2	0.07
3. Moulay-Idriss	10	0.65
4. Meknès	9	0.56
5. Marakkech	21	0.82
6. Amizmiz	11	0.60
7. Imouzzet	22	0.93
8. Taroudant	6	0.55
9. Tazmourt	10	0.76
10. Igherm	8	0.76
Nord	22	0.50
Centre	29	0.74
Sud	39	0.86
Moyenne	10,7	0,63

(1) Peuplements regroupés par région géographique, nord (1 à 4), centre (5 et 6) et sud (7 à 10). (2) DG Diversité génotypique intra-peuplement.

L'identification génétique du matériel prospecté a révélé l'originalité de certains individus (et peuplements), une proportion élevée de géotypes locaux ainsi qu'une forte diversité génotypique intra-peuplement, sous-estimée jusqu'à présent, de l'olivier cultivé au Maroc. Une caractéristique principale de ces résultats est l'existence de plusieurs géotypes multiloci sous la même dénomination « Zitoun Beldi » ou « Zit ». Ces résultats rejettent l'idée selon laquelle l'assortiment variétal marocain est considéré comme étant limité à une seule « variété population » dénommée « Picholine marocaine » et témoignent de la complexité de la structure génotypique-variétale de l'olivier au Maroc (Ouazzani et al. 1996). Cette diversité a été aussi soulignée par Maestratti (1922) qui a rapporté qu'avant les années 1920, des tribus

montagnardes cultivaient l'Olivier sous des dénominations différentes. Une dizaine de ces variétés ont été repérées lors de prospections récentes et sont en cours d'analyse. Par ailleurs, nous avons constaté que cette diversité génotypique importante est rencontrée dans les régions où les conditions écologiques (pluviométrie et types de sols notamment) permettent l'existence d'oliviers sauvages qui présentent une forte variabilité génétique (Ouazzani et al. 1993). Il semble, d'après nos résultats (Ouazzani et al. 1993, Lumaret et al. 1997, Ouazzani et Lumaret, en préparation) que les populations d'oléastres de ces régions ne peuvent pas être constituées uniquement d'arbres « ensauvagés » dérivés de la germination des noyaux issus des variétés cultivées, comme cela a été parfois relaté dans la littérature (Turrill 1951). Il existe bien une composante sauvage, avec un allèle diagnostique au niveau des estérases, plus particulièrement évidente dans le sud du Maroc (Ouazzani et Lumaret, en préparation). Cette hypothèse est aussi confirmée par l'analyse de la variation de l'ADNcp qui a révélé 2 chlorotypes propres au matériel sauvage échantillonné au Maroc (Lumaret et al., en préparation). Ces résultats montrent que la diversité mise en évidence chez l'olivier cultivé au Maroc est favorisée par le régime préférentiellement allogame de cette espèce et la coexistence dans ce pays de trois formes interfertiles de la même espèce : l'olivier sauvage spontané et abondant dans certaines régions de montagnes (cas de l'*Olea marrocana*, sud du Maroc), l'olivier ensauvagé (issu de croisements entre variétés cultivées ou entre arbres cultivés et sauvages) et de l'olivier cultivé. Cette situation pourrait engendrer un enrichissement génétique de l'olivier cultivé au Maroc qui s'est maintenue jusqu'à nos jours, vraisemblablement grâce à la faible pression de sélection humaine dans certaines régions, surtout dans les peuplements où l'intensité de culture est faible. C'est le cas des peuplements des montagnes du Sud du Maroc où la culture de l'olivier se limite à la récolte.

Les résultats obtenus dans le cadre de nos travaux sur l'identification variétale et l'évaluation de la diversité génétique de l'olivier par les allozymes des feuilles sont encourageants, comme cela a été trouvé chez d'autres arbres fruitiers (Torres 1989, Weeden 1989). Ces marqueurs enzymatiques, mis au point dans nos travaux, peuvent constituer un outil précieux et précoce d'étude de variabilité afin d'établir des programmes d'amélioration variétale. Ils devraient permettre, par exemple, à un stade précoce, de contrôler l'origine de la descendance, de détecter le pollen illégitime lors des croisements contrôlés, ainsi que d'orienter le choix des croisements, en exploitant l'hétérozygotie observée dans le but d'augmenter la variabilité. L'adjonction de marqueurs polymorphes supplémentaires et l'étude d'autres marqueurs moléculaires en plus de l'ADNcp (marqueurs RAPDs par exemple) pourraient conduire à une étude génétique plus détaillée de l'olivier afin de constituer une base de connaissance solide pour une meilleure valorisation des ressources génétiques de cette espèce et son amélioration variétale. Ceci est d'une grande importance pour l'olivier qui joue par sa culture un important rôle alimentaire et socio-économique dans de nombreuses régions agricoles du bassin Méditerranéen.

Bibliographie

1. BENZECRI J.P. (1973). L'analyse des données. II. L'analyse des correspondances. Paris, Dunod.
2. CABALLERO J.M., DEL RIO C., EGUREN J. (1990). Further agronomical information about a world collection of olive cultivars. *Acta Hort*; 286 : 45-48.
3. CHEVALIER A. (1948). L'origine de l'Olivier cultivé et ses variations. *Rev Int Bot Appl Agric Trop*; 28 : 1-25.

4. CIFERRI R. (1950). Éléments pour l'étude de l'origine et de l'évolution de l'olivier cultivé. *Act XIII Congrès International d'oléiculture*; 1 : 189-194.
5. GREEN P.S., WICKENS G.E. (1989). The *Olea europaea* complex. In : The Davis and Hedg Festschrifts (Kit Than eds), Edinburg University Press, Edinburg, 287-299.
6. LUMARET R., OUAZZANI N., MICHAUD H., VILLEMUR P. (1997). Cultivated olive and oleaster : two very closely conneted partners of the same species (*Olea europaea*) : Evidence from eunzyme polymorphism. *Boccone* 7 : 39-42.
7. LUMARET R., AMANE M., OUAZZANI N., HANY V., DEBAIN C. (en préparation). Chloroplast DNA variation in wild and cultivated olive and related *Olea* species.
8. MAESTRATTI J. (1922). L'oléiculture dans la région de Fez. *Acte V Congrès International d'oléiculture*, 96-119.
9. MORETTINI A. (1972). *L'olivicultura, 2nd ed.* Roma, Ramo Editoriale degli Agricoltori.
10. OUAZZANI N., LUMARET R., VILLEMUR P., DI GIUSTO F. (1993). Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.). *J Hered*; 84 : 34-42.
11. OUAZZANI N., LUMARET R., VILLEMUR P. (1994). An evaluation of approach the genetic variability of olive tree (*Olea europaea* L) using enzymatic markers. *Acta Hort*, 356 : 91-94.
12. OUAZZANI N., LUMARET R., VILLEMUR P. (1995). Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'olivier (*Olea europaea* L.). *àgronomie*; 15 : 31-37.
13. OUAZZANI N., LUMARET R., VILLEMUR P. (1996). Genetic variation in olive tree (*Olea europaea* L.) cultivated in Morocco. *Euphytica* 91 : 9-20.
14. OUAZZANI N., LUMARET R. (en préparation). Genetic resources of Moroccan olive tree (*Olea europaea* L.) : allozyme variation in wild and cultivated materails.
15. PIELOU E.C. (1969). *An introduction to mathematical ecology.* New York, Wiley-Interscience.
16. RUBY J. (1918). *Recherches morphologiques et biologiques sur l'olivier et sur les variétés cultivées en France.* Paris, Thèse Faculté des Sciences.
17. RUGINI E., LAVEE S. (1992). Olive. In : Hammerschlag FA, Litz RE, eds. *Biotechnology of Perennial fruit crops.* Cambridge, Cambridge University Press, pp. 371-382.
18. SCARAMUZZI F., ROSELI G. (1986). Olive genetic improvement. *Olea*; 17 : 1-17.
19. TORRES A.M. (1989). Isozyme analysis of tree fruits. In : Soltis DE, Soltis PS, eds. *Isozymes in plant biology.* Portland, Oregon, Dioscorides Press, pp. 192-205.
20. TOUS J., ROMERO A., BARRONCO D. (1990). Olive cultivars in Catalonia (Spain). *Acta Hort*; 286 : 129-132.
21. TURILL W.P. (1951). Wild and cultivated olives. *Kew Bull* 3 : 137-140.
22. WEEDEN N.F. (1989). Applications of isozymes in plant breeding. In : Janick J, ed. *Plant breeding reviews.* Portland, Oregon, Timber Press, pp. 11-54.
23. ZOHARY D., HOPF M. (1993). *Domestication of plants in the world (2nd edition).* Oxford University Press. 280pp.
24. ZOHARY D., SPIEGEL-ROY P. (1975). Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*; 187 : 319-327.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Projet PRAD « Olivier » ENA Meknès et INRA-ENSA et le CNRS de Montpellier (1995-1997) et dans le cadre d'une Bourse de Recherche IFS N° D/2615 en 1997.

D10 : Étude de la régulation de la synthèse de l'amidon de maïs à l'aide de la génétique quantitative

SÈNE M., THÉVENOT C., LEONARDI A.¹, CAUSSE M.², PRIOUL J.-L.

Institut de Biotechnologie des Plantes, Bâtiment 630, UPS, 91405 Orsay Cedex.

¹ Station de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette.

² Station d'Amélioration des Plantes Maraîchères, INRA, BP 94, 84143 Montfavet.

INTRODUCTION

L'amidon constitue de 72 à 75 % de la masse sèche des grains de maïs à maturité, alors que les protéines et les lipides n'en représentent respectivement que 9,5-10,5 % et 4,3 % (moyenne 1983-1992 pour la production française, source ONIC-AGPM). Outre son utilisation dans l'alimentation humaine et animale, l'amidon trouve de très nombreux débouchés dans l'industrie, que ce soit à l'issue de la préparation par la voie « humide » (amidonnerie) ou par la voie sèche (semoulerie). Dans tous ces domaines, ses propriétés physiques et rhéologiques sont importantes. Elles sont largement conditionnées par la composition en amylose et amylopectine, les deux constituants essentiels de l'amidon. L'amylose qui représente 20 % environ du total, est constitué de longues chaînes linéaires de 2 000 monomères de glucose, avec quelques branchements. Il a la propriété de former spontanément des gels, grâce aux nombreux ponts hydrogènes qui s'établissent entre les chaînes. L'amylopectine, constituant essentiel (70-80 %) présente au contraire une structure avec de courtes chaînes (40-50 monomères de glucose) très ramifiées. Ces ramifications forment des grappes très régulières qui donnent l'alternance de couches cristallines et amorphes, caractéristiques des grains d'amidon. Sous l'effet de la chaleur et en milieu aqueux ("empesage"), l'amidon passe en solution. En absence d'amylose, la solution d'amylopectine est plus visqueuse, ce qui en fait un « épaississant » intéressant dans beaucoup d'applications.

L'amélioration de la teneur en amidon et de sa composition passe par une meilleure connaissance des voies de biosynthèse et des points régulateurs, pour aboutir à une sélection raisonnée des gènes favorables. La voie de synthèse de l'amidon dans les grains, à partir du saccharose importé des feuilles, est complexe (figure 1). Le saccharose, déchargé du phloème dans la zone placento-chalazale, est hydrolysé par une invertase localisée dans les cellules basales de l'albumen. Puis, le saccharose est resynthétisé, avant d'être clivé par une saccharose synthase qui fournit des hexose-phosphates aux amyloplastides. À ce niveau, l'ADPglucose pyrophosphorylase synthétise l'ADPglucose qui sera utilisé ultérieurement par les amidon synthases pour former les chaînes linéaires de l'amylose et de l'amylopectine. Plusieurs enzymes de branchements et enfin une enzyme débranchante permettent la synthèse de l'amylopectine dans sa forme finale.

Dans cette voie de synthèse complexe, la contribution relative de chaque étape dans la réalisation de la composition et la quantité finale de l'amidon est difficile à établir à l'aide des méthodes physiologiques et biochimiques classiques basées sur des

MATÉRIEL ET MÉTHODES

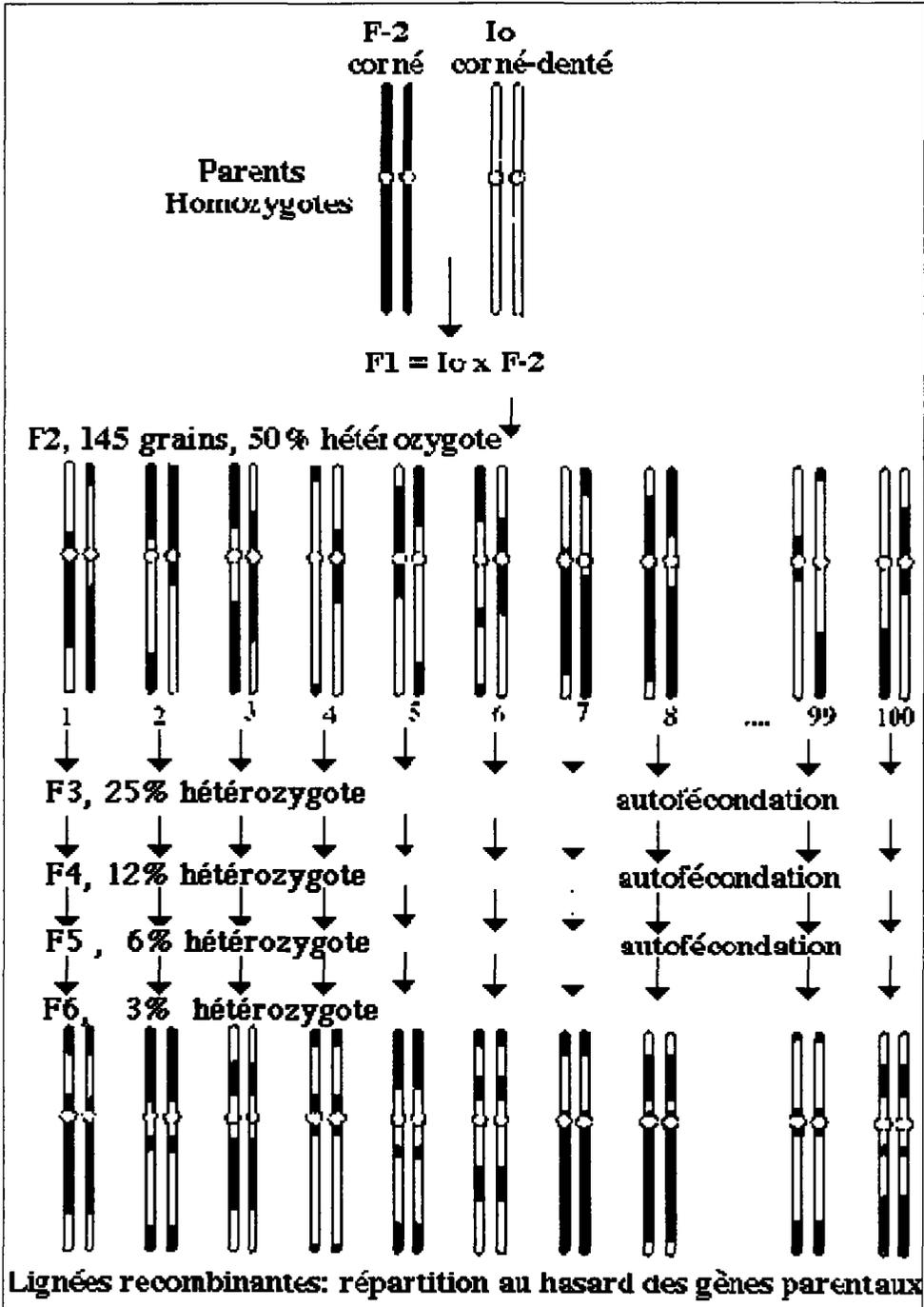
Principe de la recherche de QTL

Trois conditions sont nécessaires pour la recherche de QTL : 1) l'existence d'une descendance en ségrégation pour les caractères étudiés et comprenant un grand nombre d'individus (au moins une centaine), 2) la présence d'un polymorphisme des caractères mesurés, 3) la disponibilité d'une carte génétique saturée. Les marqueurs utilisés pour la carte génétique sont maintenant de type moléculaire. Les plus utilisés sont basés sur le polymorphisme de longueur de fragments d'ADN génomique, coupés par une enzyme de restriction (RFLP, « restriction fragment length polymorphism »). Chaque type de fragment est reconnu par hybridation avec une sonde spécifique. Cette sonde, très souvent anonyme, est choisie sur la base du faible nombre de bandes obtenues (une si possible) et de son polymorphisme d'une lignée à l'autre. Chaque combinaison de bandes est caractéristique d'un individu. Si l'on croise deux individus homozygotes, on va observer dans la descendance une recombinaison des marqueurs qui sera d'autant plus probable que les marqueurs sont plus éloignés sur les chromosomes. C'est grâce à ces fréquences de recombinaison que l'on peut établir une carte génétique des marqueurs. La carte est saturée quand le nombre de groupes de liaison est égal au nombre de chromosomes. Il faut 100 à 150 marqueurs pour obtenir ce résultat. La carte peut alors être utilisée pour localiser de nouveaux gènes (= caractères qualitatifs), en particulier les gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse à laquelle on s'intéresse. Mais une autre utilisation, plus riche, porte sur des caractères quantitatifs ; elle permet de localiser les locus contrôlant la valeur de ces caractères : ce sont les QTL (« quantitative trait loci » ou gènes à effet quantitatif). Leur détection nécessite un matériel génétique en ségrégation : les lignées recombinantes représentent souvent un matériel de choix (voir discussion. Prioul *et al* 1997). Elles sont obtenues par descendance graine à graine, à la suite du croisement de deux lignées parentales homozygotes.

À partir de la sixième génération d'autofécondation, chaque lignée obtenue est quasi-homozygote et elle contient une redistribution au hasard des gènes des deux parents (Burr & Burr 1991, figure 2). Cette répartition individuelle est déterminée sur chacune des 100 lignées à l'aide des marqueurs RFLP déjà cartographiés chez les parents. Ainsi, à chaque locus de chacune des 100 lignées, on connaît le génotype qui, dans les lignées recombinantes, ne peut être que celui du parent 1 ou celui du parent 2 (les éventuels hétérozygotes sont éliminés).

La recherche des QTL est effectuée en mesurant sur chaque lignée les caractères quantitatifs choisis (ex. nombre, longueur des feuilles, rendement, quantité d'amidon, activités enzymatiques), puis en cherchant, par des méthodes statistiques, l'association entre le génotype à un locus marqueur et la valeur moyenne du caractère. La méthode la plus simple est l'analyse de variance : si, à un locus donné, la valeur moyenne du caractère est significativement différente, selon que le génotype est de type parental 1 ou 2, on peut dire qu'au voisinage de ce locus se trouve un gène qui agit sur la valeur du caractère. C'est par définition un QTL. Trois méthodes ont été utilisées : analyse de variance (ANOVA) à un facteur (le génotype à chacun des marqueurs), la cartographie d'intervalle simple qui utilise conjointement l'information sur les 2 marqueurs flanquants (logiciel MAPMAKER/QTL de Lander & Botstein, 1989) et la cartographie d'intervalle composite qui teste simultanément l'existence de plusieurs QTL, en prenant tous les marqueurs de la carte (logiciel MQTL de Tinker & Mather, 1995). La carte établie par Causse *et al.* (1996) pour la famille de lignées utilisées comprend 145 marqueurs dont plus de la moitié correspond à des fonctions connues.

Figure 2. Obtention de lignées recombinantes avec représentation schématique de la redistribution des gènes parentaux au cours des générations (d'après Burr & Burr 1991).



Plantes : les lignées recombinantes

Le matériel végétal comprend des grains de 100 lignées recombinantes issues du croisement des lignées « F-2 » (génotype d'origine française à grain corné) et « Io » (génotype américain de type Iodent, à grain corné-denté). Cette population a été développée par Charcosset *et al.* (1994) et cartographiée par Causse *et al.* (1996). L'analyse préalable des deux parents montre des différences importantes dans la structure du grain, en particulier dans les proportions d'albumen corné et farineux. Les teneurs en amidon, amylose et amylopectine sont également différentes. Les plantes ont été cultivées sur les parcelles d'expérimentation de la Station de Génétique Végétale (INRA, UPS, CNRS) du Moulon (Gif-sur-Yvette) en deux blocs complets équilibrés, en 1994 puis en 1995.

Prélèvements

La recherche de QTL concerne à la fois des grains mûrs, pour mesurer l'accumulation finale d'amidon, d'amylose et d'amylopectine (en 1994 et 1995) et des grains en développement (en 1994), pour effectuer des mesures d'activités enzymatiques au cours du remplissage des grains. En effet, les enzymes de biosynthèse de l'amidon disparaissant à maturité, il faut rechercher leur maximum d'expression au cours du remplissage. Une campagne de prélèvements des grains, des 100 lignées recombinantes, aux stades 15, 25 et 35 jours après pollinisation a été réalisée en 1994. Vingt et un grains ont été prélevés sur 3 épis par lignée, dans chaque bloc, et conservés dans l'azote liquide. Pour le stade 15 jours, les mesures d'activité ADPglucose pyrophosphorylase, invertase et saccharose synthase sont terminées, ainsi que les contenus en glucides solubles (saccharose, glucose, fructose) et en amidon. Ceci a permis une première recherche de QTL dans les grains en développement (voir résultats). Le reste des analyses est en cours.

Mesure des activités enzymatiques, des glucides solubles et de l'amidon dans les grains en développement

Six grains, prélevés sur 3 épis différents, ont été broyés dans un volume de tampon d'extraction égal à quatre fois leur masse puis les activités ADPglucose pyrophosphorylase, saccharose synthase et invertase et les contenus en glucides solubles et en amidon ont été mesurés selon les protocoles décrits par Pelleschi *et al.* (1997).

Mesure des teneurs en amidon, amylose et amylopectine des grains mûrs

Les teneurs en amylose et amylopectine ont été mesurées par une méthode basée sur la différence de coloration par l'iode de ces deux composés : l'amylose se colore en bleu et l'amylopectine en rouge. Le spectre d'absorption en présence d'iode va varier selon les proportions relatives du mélange. Une analyse spectrophotométrique à 6 longueurs d'ondes a été adaptée au maïs par Sène *et al.* (1997). Elle présente l'avantage d'être suffisamment rapide pour permettre le traitement du grand nombre d'échantillons correspondant aux 100 lignées recombinantes.

Parallèlement les teneurs en amidon total ont été déterminées par une méthode de référence qui consiste à digérer complètement, par l'amyloglucosidase, l'amidon préalablement solubilisé. Le glucose formé est dosé par des enzymes de couplage qui conduisent à la réduction du NADH (système Boehringer, voir Sène *et al.* 1997 pour plus de détails).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

QTL d'activités enzymatiques liées à la synthèse d'amidon. Co-localisation avec des gènes de structure

La recherche de QTL pour les mesures effectuées le 15^e jour après fécondation montre des localisations sur les chromosomes 1, 4, 5 et 9 (figure 3). Certains QTL de quantité de substrat sont localisés au niveau de QTL d'une activité enzymatique : saccharose (S) ou glucose (G) et saccharose synthase (SUSY) sur le chromosome 5, glucose (G) et ADPglucose pyrophosphorylase (ADPG) sur le chromosome 9. Par ailleurs, les QTL 'G' et 'F' (glucose et fructose) sont au voisinage du même marqueur sur le chromosome 4. Ces co-localisations de QTL des quantités de substrat ou de produits et d'activités enzymatiques correspondantes ont déjà été signalées par Causse *et al.* (1995). Ce sont de bons arguments en faveur de la pertinence de ces QTL et du rôle de régulation de ces enzymes *in vivo*. Il est également frappant de constater que plusieurs QTL d'activité se trouvent proches des locus de gènes de structure d'enzyme de la voie de biosynthèse. Le cas le plus typique est celui du QTL 'ADPG', sur le chromosome 4, qui se trouve au niveau du marqueur *gsy60a-bt2* codant pour la petite sous-unité de l'isoforme s'exprimant spécifiquement dans l'albumen. Une confirmation de ce résultat conduirait à faire de ce gène un candidat expliquant la variabilité génétique de l'activité *in vivo* (voir plus loin).

Les autres co-localisations entre QTL d'activités et gènes de structures - *gsy59c-sh2* et invertase (INV) sur le chromosome 1, *gsy66-sh1* et ADPG sur le chromosome 9 - sont d'un type différent, car le gène ne code pas pour l'enzyme dont l'activité est mesurée. Cependant, comme ces enzymes appartiennent à la même voie de biosynthèse, on peut imaginer que le niveau d'expression de l'une joue sur l'autre et donc sur son activité. Ces premiers résultats seront ultérieurement comparés à ceux obtenus à 25 et 35 jours après fécondation, afin de vérifier les hypothèses formulées et d'examiner la stabilité des QTL trouvés. Cependant, on peut dès maintenant comparer ces résultats avec les variations de teneur en amidon dans les grains mûrs.

QTL de teneur en amidon et de composition en amylose et amylopectine dans les grains mûrs. Effet « année »

De nombreux QTL sont obtenus dont, cependant, la position varie avec l'année de récolte (tableau). La comparaison des localisations montre néanmoins deux QTL, dits généralistes, qui sont observés en 1994 et 1995. L'un pour l'amylose (AM), sur le chromosome 10, près de la sonde *gsy348a*, qui code une invertase soluble des grains, et l'autre pour l'amylopectine (AP), sur le chromosome 3 au site *gsy406a* qui correspond au gène de la 6-PGDH (6-phosphogluconate déshydrogénase), enzyme du métabolisme oxydatif du glucose.

Si l'on considère maintenant chaque année séparément, on peut, en 1994, faire des comparaisons avec les mesures effectuées sur les mêmes génotypes au cours du remplissage (cf. § précédent) et pour les deux années, rechercher d'éventuelles co-localisations proches des gènes de structure des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'amidon.

- Une seule localisation commune apparaît entre des QTL pour la phase de remplissage et le stade grain mûr mais elle est triple ; les QTL de l'activité enzymatique (ADPG) et du produit dérivé de la réaction, l'amylopectine (AP), se trouvent, sur le chromosome 4, au niveau du marqueur *gsy60a-bt2* qui est un gène candidat, puisqu'il code pour la petite sous-unité de l'enzyme (figures 3 et 4). En ce qui concerne AP, il faut aussi signaler la présence du marqueur adjacent *gsy315-sul*

(figure 4) qui code pour une enzyme de débranchement nécessaire à l'achèvement de la molécule.

- Au stade grain mûr en 1995, la région *gsy403-pal* du chromosome 5, où l'on trouve des QTL 'AP' et 'AM/AP' est très proche d'un gène d'enzyme de branchement *ae1* (tableau et figure 1).

Figure 3. Cartes des chromosomes 1, 4, 5 et 9 où des QTL sont obtenus, par au moins 2 méthodes, dans les grains au stade 15 jours après pollinisation (récolte 1994), pour les activités invertase acide soluble (INV), ADPglucose pyrophosphorylase (ADPG), saccharose synthase (SUSY), et les niveaux en amidon (A), glucose (G), fructose (F) et saccharose (S). Les noms des QTL sont portés à droite des chromosomes et ceux des marqueurs RFLP les plus proches sont notés à gauche, éventuellement en gras s'ils correspondent à un gène de structure de la voie de biosynthèse de l'amidon. Seuil de détection $\alpha = 0,005$ pour l'ANOVA et LOD = 2 pour MAPMAKER/QTL. Longueur des chromosomes en cm.

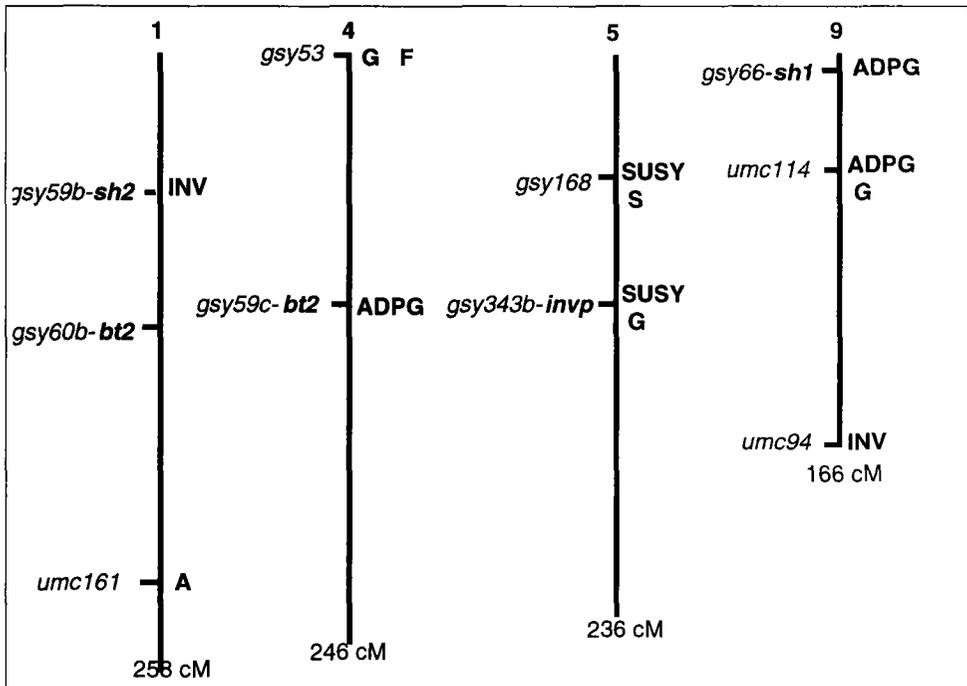


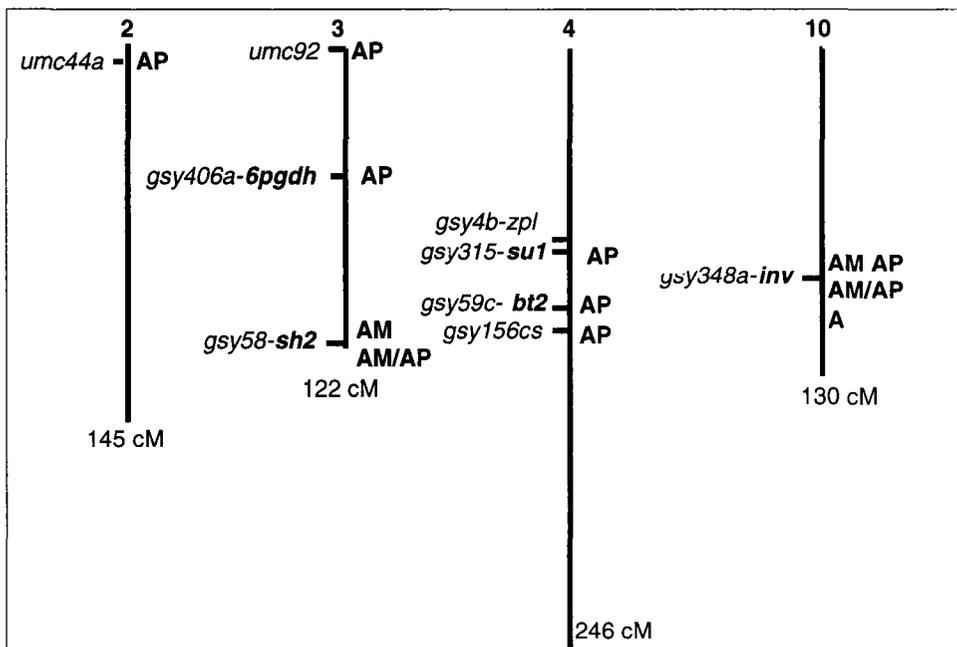
Tableau. Comparaison des QTL détectés aux loci marqueurs, par ANOVA (seuil $\alpha = 0,01$), dans une population de 100 lignées recombinantes, pour deux années successives 1994 et 1995.

Caractères	1994			Chromosomes et locus marqueurs	1995		
	Proba	Effet allèle	R ²		Proba	Effet allèle	R ²
AM				1 gsy271-P	0,0032	- 0.76	0,093
				3 umc10	0,0089	- 0.70	0,079
				3 gsy406A-6pgdh	0,0003	-1.01	0,154
	0,0046	0,72	0,094	3 gsy58-sh2			
	0,0014	0,82	0,127	10 gsy348 A-inv	*0,028	0,57	0,062
	0,0067	0,68	0,081	10 gsy54A-RP			
AP				3 umc10	0,0058	1.94	0,087
	0,0090	1,20	0,086	3 gsy406A-6pgdh	0,0089	1,99	0,084
				5 gsy403-PAL	0,0083	1.77	0,077
	0,0079	- 1,14	0,086	6 umc65			
	0,0101	-0,96	0,07	10 umc130			
AM/AP				1 gsy271-P	0,0036	- 0.03	0,090
				3 umc10	0,0029	- 0.03	0,101
				3 gsy406A-6pgdh	0,0006	- 0.04	0,141
	0,0025	0,02	0,106	3 gsy58-sh2			
				5 gsy403-PAL	0,0083	- 0.02	0,077
	0,0009	0,02	0,138	10 gsy348A-inv			

(Proba : probabilité de l'hypothèse nulle ; Effet allèle : la plus forte valeur du caractère est apportée par l'allèle parental F-2 si le signe est positif et par l'allèle parental Io si le signe est négatif ; R² : pourcentage d'explication de la variation phénotypique totale du caractère au QTL. (*) pour ce QTL la probabilité dépasse le seuil de 0.01. mais cette localisation est confirmée par une autre méthode (MQTL).

- Au stade grain mûr en 1994, d'autres co-localisations intéressantes apparaissent entre gènes de structure et composition de l'amidon (figure 4) : outre la 6-PGDH et l'invertase soluble sur les chromosomes 3 et 10, le gène sh2 (gsy58) à l'extrémité du chromosome 3, codant pour la grande sous-unité de l'ADPG-PPase, se situe au voisinage de QTL d'amylose (AM) et du rapport AM/AP. Cette dernière observation est intéressante, car elle confirme deux faits tendant à montrer le rôle important du gène sh2 dans la régulation de la synthèse *in vivo* de l'amidon. Le premier est une co-localisation de sh2 avec la teneur en amidon, mentionnée par Goldman *et al.* (1993), sur un matériel génétique très différent puisqu'il s'agissait de lignées issues d'une sélection divergente pour de faibles ou de fortes teneurs en protéines, ce qui revient à obtenir des fortes et des faibles teneurs en amidon. Le second est issu d'une démarche assez différente. Il s'agissait de comparer les produits de réversion après mutation du gène sh2 par des éléments transposables. L'excision des transposons se faisant de façon plus ou moins « propre », la séquence du révertant est fréquemment modifiée par rapport au type sauvage. Parmi ces revertants Giroux *et al.* (1996) ont montré que l'un d'eux présentait une masse de grains plus élevée et que cette particularité était due à une modification ponctuelle de la séquence de sh2 dans sa région 3' régulatrice.

Figure 4. Cartes des chromosomes 2, 3, 4 et 10 où des QTL sont obtenus, par au moins 2 méthodes, dans les grains mûrs (récolte 1994), pour les niveaux en amylopectine (AP), amylose (AM), amidon (A) et pour le rapport amylose/amylopectine (AM/AP). Les noms des QTL sont portés à droite des chromosomes et ceux des marqueurs RFLP les plus proches sont notés à gauche, éventuellement en gras s'ils correspondent à un gène de structure de la voie de biosynthèse de l'amidon. Seuil de détection $\alpha = 0,01$ pour l'ANOVA, LOD = 1,5 pour MAPMAKER/QTL et seuil >1 pour MQTL. Longueur des chromosomes en cm.



Globalement, si l'on compare les QTL contrôlant les teneurs en amylose et en amylopectine on note qu'ils ne coïncident pas, en général. Ceci est conforme à ce que l'on sait de la relative indépendance des voies de biosynthèse de ces deux produits (cf. figure 1). Cette particularité peut d'ailleurs conduire à une interprétation de l'effet « année ». On sait, en effet, que certaines enzymes de la synthèse d'amidon ont une sensibilité différente aux facteurs externes, la température en particulier. Ainsi plusieurs auteurs ont montré chez le blé d'abord, et chez le maïs ensuite (Keeling *et al.* 1994) que l'amidon synthase soluble, qui joue un rôle dans l'élongation des chaînes d'amylose, est fortement inhibée par des températures supérieures à 30 °C. Il se trouve que la plus faible teneur en amidon des grains récoltés en 1995 est due principalement à un défaut d'amylopectine plutôt qu'à amylose (Sène 1996). Un examen des relevés météorologiques de ces deux années montre qu'elles sont assez dissemblables, avec en particulier deux périodes plus chaudes, pendant le remplissage, en 1995.

CONCLUSION

La recherche de QTL pour les composantes des grains s'avère praticable aussi bien avec des caractères de composition qu'avec des caractères situés plus en amont tels que les activités enzymatiques de la voie de biosynthèse. Cette première étape

débouche sur le repérage de régions du génome impliquées dans l'explication de la variabilité génétique de ces caractères. Des caractères de nature différente, mais liés à la même fonction (produit/substrat et enzyme), présentent des QTL fréquemment localisés au même endroit (Causse *et al.* 1995). Néanmoins une variabilité inter annuelle est observée qui amène à postuler l'existence de QTL dit généralistes, présents dans toutes les conditions, et de QTL dits spécialistes, qui se manifestent selon que tel ou tel facteur est limitant pour une étape donnée. Le caractère non contingent de ces derniers tend à être prouvé par le fait qu'ils sont fréquemment situés en regard de gènes de structure qui sont d'excellents candidats à l'explication de la variance du caractère. La validation de ces gènes candidats doit être envisagée dans une seconde étape en examinant, dans un matériel génétique très diversifié où le déséquilibre de liaison est minimal, la constance de la liaison entre le polymorphisme fin du gène et la variabilité du caractère. Une autre possibilité est de faire de la cartographie fine dans un matériel quasi-isogénique sauf pour le gène en question (Touzet *et al.* 1995). À cette démarche fondamentale peut s'ajouter un objectif appliqué qui utilisera les marqueurs identifiés comme critère de sélection. Dans ce cas, on a le choix entre des marqueurs anonymes, mais liés au caractère recherché dans toutes les situations (comme les QTL généralistes) et des marqueurs qui représentent le gène qui code pour le caractère lui-même ou pour des gènes de régulation de ce caractère.

Bibliographie

1. BURR B., BURR F.A. (1991). Recombinant inbreds for molecular mapping in maize : theoretical and practical considerations. *Trends in Genetics*, 7 : 55-60.
2. CAUSSE M., ROCHER J.P., HENRY A.M., CHARCOSSET A., PRIOUL J.L., DE VIENNE D. (1995). Genetic dissection of the relationship between carbon metabolism and early growth in maize, with emphasis on key-enzyme loci. *Molecular Breeding*, 1: 259-272.
3. CAUSSE M., SANTONI S., DAMERVAL C., MAURICE A., CHARCOSSET A., DEATRICK J., DE VIENNE D. (1996). A composite map of expressed sequences in maize. *Genome*, 39 : 418-432.
4. CHARCOSSET A., CAUSSE M., MOREAU L., GALLAIS A. (1994). Investigation into the effect of genetic background on QTL expression using three interconnected maize recombinant inbred lines (RIL) populations. In *Biometrics in Plant Breeding : application of molecular markers*. J.W. van Ooijen and J.J. Jansen, *Editors.*, pp 157-189.
5. GIROUX M.J., SHAW J., BARRY G., COBB B.G., GREENE T., OKITA T., HANNAH L.C. (1996). A single gene mutation that increases maize seed weight. *Proceeding of the National Academy of Science*, 93 : 5824-5829.
6. GOLDMAN I.L., ROCHEFORD T.R., DUDLEY J.W. (1993). Quantitative trait loci influencing protein and starch concentration in the Illinois long term selection maize strains. *Theoretical and Applied Genetics*, 87 : 217-224.
7. KEELING P.L., BANISADR R., BARONE L., WASSERMAN B.P., SINGLETARY G.W. (1994). Effect of temperature on enzymes in the pathway of starch biosynthesis in developing wheat and maize grain. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21 : 807-827.
8. LANDER E., BOTSTEIN D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121 : 185-199.
9. PELLESCI S., ROCHER J.P., PRIOUL J.L. (1997). Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant, Cell and Environment*, 20 : 493-503.
10. PRIOUL J.L. (1996). Corn. In *Photoassimilate distribution in plants and crops*. E. Zamski and A.A. Schaffer, *Editors*, Marcel Dekker, New-York (Publisher), pp 549-594.

11. PRIOUL J.L., QUARRIE S., CAUSSE M., DE VIENNE D. (1997). Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. *Journal of Experimental Botany*, 48 : 1151-1163.
12. SÈNE M. (1996). Étude de la régulation *in vivo* de la synthèse de l'amidon dans les grains de maïs par des approches de génétique moléculaire quantitative. Thèse de l'Université de Paris-Sud (n° 4678), Orsay (France), pp 128.
13. SÈNE M., THÉVENOT C., PRIOUL J.L. (1997). Simultaneous spectrophotometric determination of amylose and amylopectin in starch from maize kernel by multi-wavelength analysis. *Journal of Cereal Science*, 26 : 211-221.
14. TINKER N.A., MATHER D.E. (1995). MQTL : software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. *JQTL* 1: 2 (electronic journal, access at: <http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/jqtl/>).
15. TOUZET P., WINKLER R.G., HELENTJARIS T. (1995). Combined genetic and physiological analysis of a locus contributing to quantitative variation. *Theoretical and Applied Genetics*, 91 : 200-205.

D11 : Biotechnologies et conservation des ressources génétiques à l'IPGRI (Institut international des ressources phylogénétiques)

ENGELMANN F.

IPGRI (Institut International des Ressources Phylogénétiques), Via delle Sette Chiese
142, 00145 Rome, Italie.

INTRODUCTION

L'IPGRI (Institut international des ressources phylogénétiques), successeur de l'IBPGR (Bureau international pour les ressources phylogénétiques), est une organisation internationale autonome qui opère sous l'égide du Groupe Consultatif pour la Recherche Agricole Internationale (GCRAI). Le mandat de l'IPGRI est d'avancer la conservation et l'utilisation des ressources génétiques pour le bénéfice des générations présentes et futures. L'IPGRI travaille en partenariat avec d'autres organisations, conduit des programmes de recherche et de formation et fournit des avis et informations scientifiques et techniques. L'IPGRI a quatre objectifs principaux : renforcer les programmes nationaux, contribuer à la collaboration internationale, améliorer les stratégies et techniques de conservation, et offrir un service international d'information (IPGRI, 1993).

La structure de l'IPGRI comprend un siège à Rome, cinq Groupes Régionaux, deux Groupes Thématiques ainsi que l'INIBAP (Réseau international pour l'amélioration du bananier et plantain). Les Groupes Régionaux ont la responsabilité des activités de l'Institut en Afrique Sub-saharienne ; Asie occidentale et Afrique du nord ; Asie, Pacifique et Océanie; Amériques ; Europe. Les Groupes Régionaux développent des stratégies régionales, appuient les programmes nationaux et régionaux et entreprennent des activités d'intérêt régional. Les deux Groupes Thématiques conduisent et coordonnent les activités de recherche, d'information et de formation au niveau inter-régional et global dans leurs domaines respectifs d'expertise, et fournissent un appui scientifique et technique aux Groupes Régionaux. Les deux Groupes Thématiques sont intitulés « Science et Technologie des Ressources Génétiques » (GRST), et « Documentation, Information et Formation » (DIT). L'INIBAP a son siège à Montpellier, France, et des bureaux régionaux en Afrique, Asie, Amérique et Caraïbes. Le Centre de Transit de l'INIBAP, basé à l'Université Catholique de Louvain, Belgique, maintient une collection *in vitro* de plus de 1000 accessions de bananiers et plantains et en assure également l'assainissement et la diffusion au niveau mondial (INIBAP, 1996).

L'objectif de cet article est de présenter et d'illustrer les principales activités des deux Groupes Thématiques de l'Institut ayant trait à la recherche sur les biotechnologies et à leur utilisation.

SCIENCE ET TECHNOLOGIE DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES

Le rôle du Groupe GRST est d'apporter à l'Institut et à ses partenaires un appui scientifique et technique pour la conservation et l'utilisation des espèces cultivées et

fourragères et de leurs apparentées sauvages, ainsi que des espèces forestières utiles et d'intérêt en agroforesterie. Le Groupe développe ses activités au travers des 6 projets complémentaires suivants :

- localisation et évaluation de la diversité génétique ;
- stratégies et technologies de la conservation *ex situ* ;
- conservation *in situ* des espèces cultivées et espèces sauvages apparentées ;
- stratégies globales pour les ressources génétiques forestières ;
- liens entre conservation et utilisation ;
- aspects humains et politiques de la conservation et de l'utilisation des ressources génétiques.

Pour la réalisation de ses programmes de recherche sur la mesure et la localisation de la diversité génétique, la conservation *in situ*, la conservation *ex situ* et la gestion des banques de gènes, la phytopathologie et l'utilisation des ressources génétiques, le Groupe GRST est conduit à utiliser, développer et/ou adapter différents outils biotechnologiques, incluant les techniques de culture *in vitro* et de cryoconservation, de marquage biochimique et moléculaire et les techniques de détection, indexation et caractérisation des agents pathogènes. Une attention particulière est donnée à la mise au point de techniques simples, robustes et peu coûteuses, pour faciliter leur application dans les laboratoires disposant de moyens et d'infrastructures limités.

Les techniques de culture *in vitro* trouvent des applications importantes pour la collecte, la multiplication et la conservation de nombreuses espèces, principalement d'origine tropicale ou subtropicale, qui produisent des semences récalcitrantes ou intermédiaires qui ne peuvent être conservées à long terme (Chin et Pritchard, 1988 ; Ellis *et al.*, 1990) et pour les espèces à multiplication végétative qui soit ne produisent pas de graines, ou pour lesquelles la conservation sous forme de semences ne présente qu'un intérêt limité. La culture de méristèmes, en association ou non avec la thérapie, permet la production de plantes exemptes de virus. L'échange de matériel *in vitro* réduit significativement le coût du transport et simplifie les procédures de quarantaine (Engelmann, 1997). Au cours des quinze dernières années, l'IBPGR et l'IPGRI ont mis en place des programmes de recherche pour le développement de techniques de collecte, conservation (croissance ralentie et cryoconservation) et multiplication *in vitro* de nombreuses espèces récalcitrantes et à multiplication végétative, principalement d'origine tropicale (tableau 1), dont certaines sont maintenant opérationnelles pour une utilisation en routine dans les banques de gènes, comme c'est le cas pour la pomme de terre (IPGRI, 1996a).

Dans le domaine de la phytopathologie, les recherches visent la mise au point de tests à large spectre de détection de virus, de tests non destructifs d'évaluation de l'état phytosanitaire des semences ainsi que de techniques de thérapie (IPGRI, 1997). En collaboration avec la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), l'IPGRI publie des Directives techniques pour l'échange en sécurité de matériel végétal qui font le point sur les maladies et agents pathogènes de différentes espèces cultivées, ainsi que sur leurs symptômes, hôtes, mode de transmission, techniques de détection et traitements. Des Directives techniques sont disponibles pour 16 espèces ou groupes d'espèces différentes, incluant notamment le bananier et plantain, la patate douce, l'igname, le manioc et le cocotier. La dernière publication de cette série porte sur l'Eucalyptus (Ciesla *et al.*, 1996).

Tableau 1 : Liste des espèces pour lesquelles l'IBPGR/IPGRI a participé à la mise au point de techniques de collecte, conservation (croissance ralentie et cryoconservation) et propagation *in vitro*.

Espèce	collecte	croissance ralentie	crvo-conservation	propagation
Cacaoyer	√		√	√
Agrumes	√	√	√	√
Cocotier	√	√	√	
Bananier/plantain	√	√	√	√
Patate douce		√	√	
Allium		√	√	√
Aroidacées		√	√	
Canne à sucre			√	
Vigne	√	√	√	
Igname			√	
Palmier à huile			√	
Manioc	√	√	√	
Caféier	√		√	
Pomme de terre		√	√	
Fruitiers tempérés	√		√	
Jacquier			√	
Fruitiers tropicaux	√		√	
Hévéa			√	
Thé			√	
Litchi			√	
Amandier		√	√	√
Ananas			√	
Taro			√	
Arbres tropicaux	√	√	√	√

Les programmes concernant l'étude de l'étendue et de la distribution de la diversité génétique chez les plantes cultivées expérimentent différentes techniques moléculaires, notamment microsatellites, AFLP et RAPD pour estimer la diversité génétique dans diverses situations spécifiques de portée générale (IPGRI, 1996a). Ces projets incluent l'utilisation de techniques moléculaires chez le cocotier et l'étude des liens entre les approches génétique et ethnobotanique pour la description de la diversité chez les plantes cultivées, en utilisant le taro comme espèce modèle. Un travail important a également été réalisé récemment pour évaluer les performances, l'applicabilité et le coût des différentes techniques moléculaires pour l'étude des ressources génétiques (Ayad *et al.*, 1997). Un ulletin technique intitulé "Outils moléculaires pour la conservation des ressources phytogénétiques : un guide des technologies" a été publié récemment (Karp *et al.*, 1997). Il a pour but d'aider les utilisateurs dans le choix et l'application des différentes techniques disponibles.

DOCUMENTATION, INFORMATION ET FORMATION

Le Groupe DIT est responsable d'une gamme importante d'activités variées qui ont trait à l'information et à la documentation. Elles incluent la documentation des ressources génétiques, les services de bibliothèque et d'information, les publications, la formation, l'information et la sensibilisation du public ainsi que l'évaluation de l'impact des activités de l'Institut.

Dans le domaine de la documentation des ressources génétiques, les marqueurs biochimiques et moléculaires sont maintenant intégrés dans les listes de descripteurs pour les plantes cultivées produits par l'IPGRI. Les trois dernières listes de descripteurs, pour la tomate, le caféier et la bananier (IPGRI, 1996 b et c ; IPGRI-INIBAP/CIRAD, 1996) ont été publiées à la fois en anglais, espagnol et français afin d'étendre leur diffusion.

De nombreuses publications de l'IPGRI ont trait à différents aspects de l'utilisation des biotechnologies en relation avec la conservation des ressources génétiques. Si la plupart des publications de l'IPGRI sont rédigées en anglais, un important effort est réalisé pour en traduire un nombre croissant en espagnol et en français, afin d'améliorer leur diffusion auprès des chercheurs hispanophones et francophones. L'IPGRI produit notamment, en collaboration avec CABI, Grande Bretagne, les Résumés sur les ressources génétiques végétales (Plant Genetic Resources Abstracts) qui incluent une section sur les biotechnologies. Le Bulletin des ressources phytogénétiques, réalisé en collaboration avec la FAO, publie des articles de recherche et de synthèse en anglais, espagnol et français, sur de nombreux domaines des ressources phytogénétiques. Des informations plus détaillées sur les publications de l'IPGRI sont accessibles par Internet (<http://www.cgiar.org/ipgri>).

La formation tient une place importante dans les activités de l'IPGRI. Jusqu'à ce jour, près de 2000 personnes (techniciens, chercheurs, curateurs de banque de gènes, etc.) ont reçu une formation organisée par l'Institut, sous la forme de périodes de formation individuelle (courte à longue durée) ou de participation à des cours généraux ou spécialisés. Le personnel de l'IPGRI est également souvent impliqué dans des activités de formation délivrées par d'autres organismes.

L'IPGRI collabore avec différentes universités dans les pays en voie de développement pour la mise en place de programmes universitaires (niveau Maîtrise) ciblés sur les ressources génétiques, produit et distribue du matériel de formation. L'IPGRI a ainsi initié récemment la production de modules de formation (IPGRI, 1995, 1996), dont le dernier est intitulé "Mesure de la variation génétique par l'utilisation des marqueurs moléculaires" (Ford-Lloyd et Painting, 1996). Ces modules sont accessibles par Internet (<http://www.cgiar.org/ipgri/training/10-1/>) et également disponibles sous forme de disquettes.

CONCLUSION

L'IPGRI déploie une large gamme d'activités de recherche, documentation, information et formation dans lesquelles de nombreux outils biotechnologiques, tels que la culture *in vitro*, la cryoconservation, le marquage biochimique et moléculaire pour la caractérisation et l'évaluation de la diversité génétique, les techniques de détection, d'indexation et de caractérisation des agents pathogènes jouent un rôle important. Le développement de nouvelles techniques ou l'adaptation de techniques existantes visant à améliorer la conservation des ressources phytogénétiques, menés en collaboration avec ses nombreux partenaires du Sud et du Nord est un des objectifs prioritaires de l'IPGRI.

Bibliographie

1. AYAD W.G., HODGKIN T., JARADAT A., RAO V.R. (eds.). 1997. Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources: Report of an IPGRI Workshop, 9-11 October, 1995, Rome, Italy. International Plant Genetic Resources Institute, Rome. Sous presse.
2. CIESLA W.M., DIEKMANN M., PUTTER C.J.A. (eds.). 1996. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 17. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
3. CHIN H.F., PRITCHARD H.W. 1988. Recalcitrant Seeds, a Status Report. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italie.
4. ELLIS R.E., HONG T., ROBERTS E.H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. coffee. *J. Exp. Bot.* 41 : 1167-74.
5. ENGELMANN F. 1997. *In vitro* conservation methods. Sous presse in *Biotechnology and Plant Genetic Resources : Conservation and Use*, B.V. Ford-Lloyd, J.H. Newbury and J.A. Callow, Eds., CABI, Wallingford, GB.
6. FORD-LOYD B.V., PAINTING K.A. 1996. Measuring Genetic Diversity using Molecular Markers. Version 1.2 International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
7. KARP A., KRESOVICH S., BHAT K.V., AYAD W.G., HODGKIN T. 1997. Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation : a Guide to Technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
8. INIBAP. 1996. Annual Report. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.
9. IPGRI. 1993. Diversity for Development. The Strategy of the International Plant Genetic Resources Institute. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
10. IPGRI. 1996a. Annual Report 1995. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
11. IPGRI. 1996b. Descripteurs de la tomate (*Lycopersicon* spp.). Institut international des ressources phylogénétiques, Rome, Italie.
12. IPGRI. 1996c. Descripteurs du caféier (*Coffea* spp. et *Psilanthus* spp.). Institut international des ressources phylogénétiques, Rome, Italie.
13. IPGRI. 1997. Annual Report 1996. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
14. IPGRI-INIBAP/CIRAD. 1996. Descripteurs pour le bananier (*Musa* spp.) Institut international des ressources phylogénétiques, Rome, Italie ; Réseau international pour l'amélioration de la banane et la banane plantain, Montpellier, France , Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Montpellier, France.

SECTION D

**Textes et résumés des Affiches
de D12 à D37**

D12 : Marqueurs isoenzymatiques et structures génotypiques de populations spontanées d'espèces du genre *Medicago*

ABDELKEFI A., BIBORCHI A., BOUSSAID M.¹, MARRAKCHI M.

Laboratoire de génétique et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences de Tunis. ¹ Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis.

L'électrophorèse d'enzymes représente un bon outil pour établir des marqueurs génétiques utiles dans l'évaluation des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. L'analyse du déterminisme génétique de 7 systèmes enzymatiques (LAP, PGI, PGM, 6-PGD, GOT, ICD, MDH) a permis de mettre en évidence 6 loci polymorphes chez *Medicago ciliaris* et *Medicago intertexta*, espèces annuelles et tétraploïdes. L'étude des structures génotypiques montre, d'une part une forte homozygotie de *Medicago ciliaris* témoin de son régime préférentiellement autogame et d'autre part une hétérozygotie chez *M. intertexta* révélatrice d'une aptitude à l'allopollinisation. L'échange génique entre ces deux taxons est détecté par l'analyse électrophorétique de deux populations naturelles sympatriques. *Medicago intertexta* et *Medicago ciliaris* constitueraient, dans la section des intertextae, deux compartiments spécifiques définis en fonction de leur régime de reproduction respectif. Chez les espèces pérennes et tétraploïdes, la technique d'électrophorèse pose de sérieux problèmes de lecture et d'identification génotypique à partir des phénotypes isoenzymatiques révélés. Les électrophorèses sur gel d'amidon, réalisées à partir d'un large échantillon d'individus diploïdes et tétraploïdes appartenant à différentes espèces du complexe des *Medicago* pérennes, révèlent pour les systèmes isoenzymatiques variables des bandes électrophorétiques de même niveau de migration pour les deux niveaux de ploïdie, mais avec des différences d'intensité des bandes typiques des formes tétraploïdes. Il est donc probable qu'un système isoenzymatique donné aurait le même type de contrôle génétique chez les deux niveaux de ploïdie avec des différences dues au dosage allélique chez les formes tétraploïdes. Pour chaque locus déterminé chez les diploïdes, les différents profils théoriques possibles chez les tétraploïdes sont établis en fonction du dosage allélique. Les différents génotypes ainsi ciblés sont soumis à des autofécondations et leur descendance est analysée. L'ensemble des résultats analysés confirme l'hypothèse du contrôle génétique retenu chez les diploïdes et met en évidence l'effet du dosage allélique sur l'intensité des bandes électrophorétiques chez les tétraploïdes.

D13 : Évaluation des peroxydases comme marqueurs de la tolérance à la salinité chez les céréales. Relation avec le calcium

AOUAD A.¹, BAAZIZ M.¹, MERGOUM M.²

¹ Laboratoire de Biochimie et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences-Semlalia, B.P. S15, Marrakech, Maroc

² Centre Régional de Recherches Agronomiques, INRA, B.P. 589, Settat, Maroc

Les céréales jouent des rôles importants dans l'alimentation humaine. De ce fait, la céréaliculture occupe une place importante dans l'agriculture mondiale. Cependant, plusieurs facteurs environnementaux, tels que la sécheresse et la salinité, entravent la production des céréales, surtout dans les régions arides et semi-arides. L'amélioration et la sélection de variétés tolérantes aux stress environnementaux, constitue une solution idéale pour résoudre ce

problème, surtout lorsque cette sélection est assistée par des marqueurs biochimiques ou moléculaires. Les peroxydases, oxydoréductases très répandues chez les plantes, sont souvent utilisées comme marqueurs de la tolérance à de nombreux stress biotiques et abiotiques. L'évaluation de ces enzymes comme marqueurs de la tolérance à la salinité chez les céréales a permis de caractériser les variétés d'orges et de triticale, qui se sont montrées plus tolérantes à la salinité, par une augmentation de l'activité de leur peroxydases ionique des racines. Le calcium, élément qui joue un rôle important dans la nutrition des plantes, est souvent impliqué dans la résistance des plantes à la salinité. L'effet de cet élément sur la croissance de 10 variétés de céréales, cultivées en milieu hydroponique, et sur leur activité peroxydasique est déterminée. Les résultats obtenus montrent que des faibles concentrations en calcium stimulent légèrement la croissance des feuilles en présence et en absence du stress salin. Celle-ci est inhibée lorsque la concentration du calcium atteint 10 mM pour les feuilles et les racines. L'effet du calcium sur les peroxydases se manifeste par une augmentation des activités des peroxydases solubles des racines, en présence et en absence du stress salin. Quant aux peroxydases ioniques, liées aux parois cellulaires, elles sont activées chez les variétés tolérantes et inhibées chez les autres variétés. La relation entre le calcium et les peroxydases et leurs rôles dans la tolérance à la salinité chez les céréales sont discutées.

D14 : Variabilité génétique des caractères de la ramification des plantules d'arganier

BANI-AAMEUR F., ZAHIDI A.

Laboratoire de Recherche sur la Variabilité Génétique, Université Ibnou Zohr, Faculté des Sciences. B.P. 28/s, 80000 Agadir, Maroc.

Cinq types morphologiques de port des arganiers (*Argania spinosa* (L.) Skeels) adultes sauvages chevauchent entre le port très épineux très ramifié et le type inerme peu ramifié. Sa domestication en tant qu'arbre fruitier oléicole, passe par la production de plants accessibles aux techniques culturales telles que la taille et la récolte. Ces techniques seraient plus aisées avec des plants raisonnablement ramifiés et peu épineux. La variabilité génétique de neuf caractères de la ramification de la tige a été observée chez des plantules âgées d'un an élevées en pépinière. Les effets de la provenance, de la famille et du génotype des plantules ont été étudiés chez dix familles originaires de chacune des trois localités du sud ouest du Maroc : Ait Mellouil, Argana et Ait Baha. Quel que soit le caractère de la ramification, l'effet provenance n'était pas significatif. Par contre, l'effet famille était significatif pour les longueurs de la tige et des rameaux secondaires, et, pour le nombre de rameaux tertiaires. Les moyennes des hauteurs des tiges variaient entre 69,3 et 6,5 cm. Toutes les tiges n'étaient pas ramifiées. Quand ils étaient présents, le nombre de rameaux secondaires variait entre 20 et 2 ; et leurs longueurs étaient comprises entre 44,3 et 2,3 cm. Quand les rameaux tertiaires se montraient, leur nombre était compris entre 9 et 0,14. Les différences entre les plantules d'une même famille étaient hautement significatives pour l'ensemble des caractères, exception faite du nombre de rameaux tertiaires. Ainsi la sélection pour ce caractère serait plus efficace au niveau familial. Les héritabilités au sens stricte de la longueur de la tige et du rameau secondaire étaient les plus élevées (0,38). L'héritabilité du nombre de rameaux tertiaires était de 0,22. La plus faible héritabilité (0,06) était observée pour le nombre de rameaux secondaires. Ces héritabilités illustrent l'ampleur des intervalles de progrès potentiel exploitable par un programme d'amélioration génétique orienté vers la domestication de l'arganier.

D15 : Identification de cultivars du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par l'amplification aléatoire d'ADN (RAPD).

BEN ABDALLAH A.^{1,2,3}, STITI K.², LEPOIVRE Ph.³, DU JARDIN P.²

¹ Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Rue Hédi Karray 2049 Ariana (Centre de Recherches Phoenicoles, 2260 Degache) - TUNISIE. ² Unité de Biologie végétale - Faculté

Universitaire des Sciences Agronomiques Passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux - BELGIQUE.

³ Unité de Phytopathologie - Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Passage de Déportés. 2 B-5030 Gembloux - BELGIQUE.

L'analyse de l'ADN génomique des feuilles du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) chez quatre cultivars femelles (Deglet nour, Allig, Kentichi, Menakher), un génotype mâle (T23) et leurs descendants hybrides a été réalisée par la technique RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). Des amorces donnant des résultats reproductibles et révélant un polymorphisme au sein de cet ensemble des génotypes ont été sélectionnées. 53 bandes polymorphes (soit 12,5 % du total des bandes) résultent de l'utilisation de 11 amorces sélectionnées parmi 122 testées. Ces marqueurs RAPD ont permis aussi bien de caractériser et de distinguer les différents cultivars que de différencier les géniteurs de leurs descendants. La reproductibilité des résultats et le polymorphisme suffisamment élevé font de ces marqueurs un outil potentiel pour l'identification variétale chez le palmier dattier. La méthodologie suivie dans cette étude pourrait servir pour l'évaluation du potentiel phoenicole, qui souffre d'un manque de critères discriminants, ainsi que pour l'assistance à des programmes d'amélioration variétale.

Mots clefs :

Phoenix dactylifera L., RAPD, identification variétale, polymorphisme, marqueur moléculaire.

D16 : Aptitude à l'embryogenèse somatique chez le pois : analyse diallèle et contrôle génétique

BENCHEIKH M.

Institut d'Agronomie, B.P. 151 02000 Chlef, Algérie.

À partir d'apex de plantules de 5 jours, des structures embryonnaires de pois ont été obtenues sur un milieu inducteur d'embryogenèse somatique proposé par Kisely *et al.* (1987). Plusieurs lignées (30) ont été testées. Elles ont montré des différences significatives tant pour le pourcentage de cals embryogènes que pour le nombre de structures embryonnaires par cal embryogène.

L'analyse quantitative par l'utilisation des croisements diallèles, menée avec 6 lignées ayant des potentiels différents de régénération et leurs combinaisons hybrides respectives, a révélé des effets additifs importants. Cependant, malgré l'importance des effets additifs, l'analyse génétique semble montrer deux systèmes génétiques : l'un avec dominance favorable et l'autre avec dominance défavorable. L'étude de la ségrégation d'une génération F2, issue d'un

croisement entre deux lignées très différentes, semble confirmer l'hypothèse d'un déterminisme génétique relativement simple avec peu de locus en jeu.

La recherche de marqueurs moléculaires de l'ADN nucléaire, par la technique RFLP, a permis de mettre en évidence 3 marqueurs liés faiblement à des QTL de l'embryogenèse somatique. Cependant le passage par une régression multiple progressive permet d'expliquer, avec 6 marqueurs dont 2 liés, 44 % de la variance de l'embryogenèse somatique.

D17 : Composition variétale des palmeraies marocaines révélée par méthode isoenzymatique

BENDIAB K.², BAAZIZ M.¹

¹ Laboratoire de Biochimie et Amélioration des Plantes, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, B.P. S 15, Marrakech, Maroc.

² Laboratoire de Biochimie, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences et Techniques de Gueliz, B.P. 618, Marrakech, Maroc.

En se basant sur l'électrophorèse des enzymes, 28 cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), connus par leurs caractères morphologiques, sont identifiés en utilisant des systèmes enzymatiques plus actifs chez cette espèce : estérases (EST), endopeptidase (ENP) et Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT). Ainsi, 8, 6 et 7 phénotypes électrophorétiques respectifs ont été révélés en utilisant des extraits de feuilles. Les combinaisons des phénotypes ont permis d'obtenir une clé d'identification des cultivars de palmier dattier basée sur les phénotypes électrophorétiques. La composition variétale de 11 palmeraies marocaines différentes par leur répartition géographique, est réalisée. A l'exception des palmeraies de M'Hamid et Rissani, plus de 50 % des palmiers restent non identifiés en se basant sur la clé établie. Ces données sont confirmées par la prédominance des palmiers provenant de graines et appelés 'Khalts'. Les cultivars les plus fréquents dans les 11 palmeraies sont 'Jihel' et 'Bou-Feggouss', connus par leur bonne qualité fruitière. L'analyse factorielle des correspondances utilisant les fréquences des phénotypes isoenzymatiques, a montré que la palmeraie de Marrakech, située dans la partie nord du Haut Atlas, est liée aux palmeraies de Skoura, Ait Atman, Ksar Jdid et Ksar Sifa. Les populations de palmiers dattiers de Zagora, M'hamid et Rissani, formant un seul groupe, sont caractérisées, respectivement, par les cultivars 'Bou-Sthammi Noire', 'Bou-Skri' (et Iklane) et 'Bou-Feggouss'. L'assortiment variétal obtenu sur la base des isoenzymes est comparé à celui déterminé à l'aide des critères morphologiques de la datte.

D18 : Le germoplasme de blé dur en Algérie : son "érosion" et les perspectives de sa réhabilitation

BENLARIBI M.

I.S.N. Université de Constantine, Algérie.

La multitude de variétés locales de blé dur constitue jusqu'aux années soixante (1960) un potentiel original de grande valeur.

Ce potentiel en ressources phylogénétiques atteignant actuellement un degré d'"érosion" très poussé avant même d'avoir été valorisé se compose de variétés traditionnelles sélectionnées

dans des populations locales peu productives certes, mais demeurent le mieux adaptées aux conditions bioclimatiques et agronomiques d'une part, et aux habitudes sociales, particulièrement l'association céréales - élevage, d'autre part.

Il perd chaque jour du terrain malgré ses qualités devant l'introduction précipitée de cultivars dits à "haut rendement" qui sont sélectionnés dans d'autres conditions géo-écologiques et ne possédant aucune capacité de réponse à l'itinéraire technique suivi et encore moins aux conditions de sécheresse en Algérie.

D'ailleurs, la majorité de ces variétés d'introduction a disparu avant même d'être généralisées à travers le pays laissant un grand vide en matière de génotypes de blé dur.

Malgré cette évidence pratique, tous les programmes d'amélioration engagés depuis près de vingt ans, sans grand résultat d'ailleurs, partent d'un matériel végétal d'introduction, éludant le germoplasme local.

Devant cette situation une stratégie de réhabilitation des ressources de blé dur comme d'autres espèces végétales est envisagée par les services concernés.

D19 : Embryogenèse somatique chez *Phoenix dactylifera* L. : effet du cultivar sur la composition phénolique et le brunissement des cals

EL BELLAJ M., EL IDRISSEI-TOURANE A., EL HADRAMI I.

Laboratoire de Physiologie Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences-Semlalia. B.P. S15.
40 001 Marrakech, Maroc

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une monocotylédone pérenne adaptée aux conditions écologiques rudes des zones sahariennes et subsahariennes. Sa prolifération dans ces régions permet la création des oasis dont l'importance socio-économique est considérable pour une population humaine non négligeable. Actuellement, l'existence de cette espèce est menacée par plusieurs facteurs particulièrement la sécheresse et la maladie vasculaire connue sous le nom de bayoud. À elle seule, cette maladie est responsable de la destruction des 2/3 des palmeraies marocaines, sévit actuellement en Algérie et risque de s'étendre à d'autres pays. La reconstitution et le repeuplement des palmeraies par des cultivars de bonne qualité dattière, résistants aux maladies et aux stress, demande un grand nombre de plants. À présent, les biotechnologies appliquées à la multiplication du Palmier dattier reposent essentiellement sur la seule technique d'organogenèse qui s'est avérée insuffisante pour répondre à une demande de plus en plus importante. La nécessité de développer la recherche sur l'embryogenèse somatique s'impose donc pour, entre autres, alimenter régulièrement les phoeniculteurs en vitroplants. Cependant, la récalcitance de certains cultivars du dattier vis-à-vis de cette technique, qui se manifeste essentiellement par un brunissement des tissus au cours de la phase d'induction de la callogenèse, nécessite la compréhension des mécanismes biochimiques impliqués dans ces phénomènes.

Dans ce travail, un suivi de l'évolution de la composition phénolique, composante essentielle du phénomène de brunissement tissulaire, des cals de plusieurs cultivars de dattier a été réalisé. Les résultats révèlent que les cultivars BSTN et BFG présentant des indices de brunissement élevés (0,42 et 0,34 respectivement), possèdent une plus grande capacité à dégrader les composés phénoliques comparés aux cultivars JHL et IKL dont le degré de brunissement ne dépasse pas 0,20 et 0,22 respectivement. Il existe donc une relation positive entre l'aptitude des tissus à brunir et le potentiel de dégradation des phénols chez les cultivars étudiés. Les analyses

de la composante phénolique effectuées sur d'autres cultivars pendant la même phase de callogenèse ont permis de distinguer deux grands groupes se caractérisant par un indice de brunissement supérieur ou inférieur à 0,3. Dans le premier cas, les cals bruns contiennent plus de phénols totaux et de flavanes ainsi qu'un indice de polymérisation des flavanes plus élevé par rapport aux cals non bruns de ces mêmes cultivars. C'est le cas ici de HAFS, BSL, BSTN, KRN et BFG. Dans le deuxième cas, les cals qui ne brunissent pas ou peu se présentent plus riches en phénols totaux et en flavanes ; il s'agit particulièrement des cultivars MJHL et JHL. Par ailleurs, il a été relevé que le rapport flavanes/phénols totaux est ici nettement inférieur à celui du premier groupe de cultivars. L'approfondissement de ces données est d'une importance certaine pour la maîtrise de l'embryogenèse somatique et l'adaptation des milieux de culture aux différents cultivars étudiés chez le dattier. Le degré d'implication des composés phénoliques dans la récalcitrance des cultivars vis-à-vis de l'embryogenèse somatique sera discuté.

D20 : Étude comparative d'hybrides interspécifiques issus de croisements entre quatre espèces d'*Aegilops* et des blés cultivés (*Triticum aestivum*, *T. durum*)

EL KHLIFI O.K.¹, BENLHABIB O.², MALKI M.¹

¹ Faculté des Sciences Casablanca Ain Chock, Casablanca, Maroc.

² I.A.V. Hassan II, Rabat, Maroc.

Des croisements interspécifiques entre le blé tendre (*Triticum aestivum*) ou dur (*T. durum*), et différentes espèces d'*Aegilops* (*Ae. ovata*, *Ae. triaristata*, *Ae. squarrosa* et *Ae. ventricosa*), ont été entrepris. Seules les accessions résistantes à la mouche de Hesse ou Cécidomyie (*Mayetiola destructor say*) ont été employées afin de transférer cette résistance au blé. Le sauvetage des embryons hybrides immatures a été utilisé.

Une étude comparative de l'aptitude au croisement des quatre espèces d'*Aegilops* avec les blés cultivés, rend compte que le taux de nouaison n'est pas le meilleur critère pour juger la réussite d'un croisement. La viabilité et la fertilité des F₁ et de leurs descendants sont plus discriminants. Les taux élevés de plantes hybrides ont été obtenues chez *Ae. ovata* croisé au blé tendre, soit 12 %. Cependant, toutes les plantes sont létales, et ne conduisent à aucune descendance. Les taux de plantes hybrides ont été au contraire de 0,5 % seulement, chez *Ae. squarrosa*, mais ont conduit à la formation de plantes viables et fertiles en F₁, F₂ et BC₁. Les causes de ces différences sont discutées.

La fertilité des hybrides a été très variable, aussi bien en autofécondation qu'en rétrocroisement. Cette variabilité a été observée entre les familles, mais aussi à l'intérieur des familles, surtout celle issue du croisement entre *Ae. triaristata* et le blé dur. La fertilité du pollen des hybrides F₁ de ce croisement, a varié de 0 à 89 %.

Les descendants BC₁ ont présenté des taux de germination souvent faibles et des taux de mortalité importants. Les descendants F₂ ont présenté moins de problèmes de variabilité.

L'aptitude au croisement interspécifique du blé dur a été généralement plus faible que celle du blé tendre. Mais en croisement réciproque, le blé tendre s'est montré souvent, plus récalcitrant. Il n'a formé des plantes hybrides qu'avec *Ae. ovata*.

Trente-sept hybrides interspécifiques ont été installés au champ pour leur caractérisation morphologique. Le comptage du nombre de chromosomes et une analyse méiotique ont été également réalisés.

La plupart des critères d'évaluation utilisés dans l'analyse morphologique et de résistance aux maladies, ont souvent permis de caractériser les différents hybrides. La résistance à la rouille noire et au mildiou, le port de la plante et la forme de l'épi, sont des caractères transmis à la majorité des hybrides, du parent sauvage.

Le nombre de chromosomes a été souvent celui attendu chez les hybrides interspécifiques, soit 28 quand l'espèce sauvage tétraploïde est croisée au blé dur, et 35 quand celle-ci est croisée au blé tendre. Un doublement spontané des chromosomes a été noté chez les hybrides viables issus d'*Ae. squarrosa*.

L'analyse des cellules mères de pollen a montré de faibles taux d'appariements chromosomiques, particulièrement, chez les hybrides issus d'*Ae. ventricosa* croisé au blé dur. Certains de ces derniers sont présentés jusqu'à 25,55 univalents. Mais pour ceux issus d'*Ae. Squarrosa*, les appartements ont été relativement importants, soit jusqu'à 19,6 bivalents.

D21 : Relation virulence et polymorphisme de l'ADN chez *Aschochyta rabiei* parasite du pois chiche (*Cicer arietinum*)

HAMZA S.

Laboratoire de Génétique, Institut National Agronomique de Tunis, 43 av. Charles Nicolle. 1082 Tunis.
Tunisie.

La variabilité génétique de cent cinquante cultures monosporelle d'*Aschochyta rabiei* isolées à partir de cinq localités différentes de la région de Béja ont été analysées par la méthode RFLP en utilisant les simples séquences répétées (SRS). L'ADN génomique a été digéré par les enzymes de restriction HinfI et RsaI et séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. L'hybridation avec les SRS du type (GATA), (CA)_n, a permis de regrouper les 150 isolats en 17 génotypes et classés selon leurs relations phylogénétiques. L'analyse RAPD utilisant 8 amorces decamères a permis la différenciation des 17 génotypes indiquant le pouvoir discriminatif de cette méthode. La virulence des 17 génotypes a été réalisée sur une série différentielle composée de 8 variétés. Cette analyse a permis de distinguer 8 pathotypes avec une prépondérance du pathotype 1 et 2 virulent qui regroupent plus de la moitié des génotypes. La classification phylogénétique obtenue par analyse RFLP n'est pas corrélée à la classification des groupes de virulence. Cette faible association entre les profils RFLP et la virulence montre que le polymorphisme de l'ADN est indépendant de la virulence et s'explique par le mode de reproduction sexuée du champignon dont la forme a été observée dans les débris foliaires de pois chiche.

D22 : Variabilité morphologique chez des descendances maternelles d'*Atriplex halimus*

HANÈNE H.

Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire 2020 Sidi thabet, Tunisie.

La valorisation des sols marginaux nécessite l'introduction de plantes fourragères tolérantes aux conditions extrêmes du milieu, parmi lesquelles les *Atriplex* prennent une place de choix. En Tunisie, *Atriplex halimus* occupent les régions semi-arides et arides. Le maintien et la multiplication de cette espèce autochtone nécessite une meilleure connaissance de sa biodiversité naturelle. Les semences récoltées plante par plante pour l'ensemble des localités repérées nous permettent d'évaluer la variabilité intra-plante (descendances maternelles) et la variabilité entre plantes de différentes origines, cette étude a été menée *in vitro* et *in vivo*, en culture hydroponique.

En culture *in vitro*, les plantules issues de graines sont cultivées sur le milieu de culture Murashige et Skoog à différentes concentrations. Cette expérience met en évidence l'influence de la composition minérale du milieu de culture sur la croissance des jeunes plants. Pour le deuxième essai, nous avons utilisé des semences de deux origines différentes du point de vue étage bioclimatique. Les caractères mesurés concernent la croissance végétative et les teneurs en azote protéique des feuilles. Le traitement des données par analyse de variance multivariée a montré des différences entre plantules issues des graines prélevées d'un même pied mère c'est-à-dire des descendances maternelles ou demi-frères. Nous avons remarqué également, que l'écart entre plantes d'une même origine est d'autant plus grand que ceux-ci proviennent d'une parcelle accessible aux vents, ce qui peut être expliqué par la reproduction allogame de ces plantes.

D23 : La collection des espèces végétales à la faculté des sciences agronomique, un exemple original de la conservation *in situ* de la diversité biologique

HOUNKPEVI A.

INTRODUCTION

Le Bénin est un petit pays aux ressources naturelles limitées de 112.622 km² avec une population estimée à 5.000.000 habitants. La densité de population varie de 450 hab/km² au Sud à 10 hab/km² au Nord du pays.

On assiste dans le Sud du pays à une forte pression sur les ressources naturelles engendrant ainsi la fragmentation des écosystèmes végétaux. Cette fragmentation n'est pas sans conséquence sur la structure des peuplements et des populations végétales.

En effet, certaines espèces vivrières ou médicinales et des écosystèmes forestiers sont actuellement menacés d'extinction. Par exemple, certains fruitiers du périmètre urbain de Cotonou et les mangroves de la zone lagunaire de Cotonou-Ouest.

Certaines espèces sont devenues rares ou ne se retrouvent que sous forme de pieds isolés protégés et entretenus par les paysans lors de défrichements. C'est le cas du néré (arbre à moutarde), le kapokier, le karité (oléagineux).

Certaines plantes à espèce, et condiments ne se retrouvent plus à l'état spontané dans les formations végétales. Par exemple : le gingembre, le poivre, le piment, le gombo etc.

C'est donc dans le but de sauvegarder les espèces de grande culture et de promouvoir les espèces utiles en voie de disparition qu'a été initié à la FSA depuis 1994, le programme de collection des espèces végétales.

OBJECTIFS

L'objectif global de ce programme est la conservation *in situ* des espèces de grande culture et des espèces dites « mineures » d'importance socio-économique non négligeable à des fins pédagogique et de recherche.

De façon spécifique, il s'agira :

- d'œuvrer pour la conservation *in situ* des espèces cultivées et/ou rares et de leurs ressources génétiques ;
- de caractériser et évaluer les espèces ciblées ;
- d'exploiter la collection vivante dans des programmes de formation et de recherche pluridisciplinaire ;
- de maîtriser la culture ou la sylviculture de ces espèces ;
- de transférer le paquet technologique des acquis en milieu réel (Paysans et Productions Privés) en collaboration avec les structures nationales de recherche et de développement (I.N.R.A.B., C.A.R.D.E.R., etc.).

LES ACQUIS

Le tableau ci-après présente les différentes espèces installées de 1994 à 1997 par DO CAO*.

Espèces	Nombre	Observations
Ornementales	74	DA CAO : coopérant français chargé de cours de Phytotechnie Spéciale à la FSA (1992-1997)
Fruitières	19	
Espèces	10	
Manguiers	7	
Cocotiers	5	
Bananiers	19	
Agrumes	21	
Cannes à sucre	3	
Citronnelles	2	
Ananas	3	
Bambous	3	
Gingembre	3	

Par HOUNKPEVI

À partir de cette collection, la pépinière a déjà commencé à produire des plants greffés (manguiers et citrons) et des jeunes plants pour les programmes de reboisement.

PERSPECTIVES

La collection actuelle n'est qu'une première phase. Elle sera complétée progressivement à partir :

- de nouvelles prospections à l'intérieur du Bénin

- des introductions de l'extérieur (Togo, Niger, Burkina Faso, Nigeria...) et à partir des banques de gènes des Organismes Internationaux dotés de structures de conservation à moyen et long termes.

Cette nouvelle série de collections prendra en compte, les formes sauvages disponibles, les espèces dites « mineures » et d'importance socio-économique non négligeable (Fonio, aracée etc.) et les espèces d'intérêts pharmacologique.

Enfin, la collection sera exploitée dans des programmes de recherche pluridisciplinaire avec un accent particulier sur les manipulations en biotechnologie végétale avec production de vitro-plants indemnes du complexe virus-bactérie (exemple : manioc, bananier, niébé, gingembre etc.).

D24 : Variabilité génotypique et analyse biochimique des capacités embryogènes et organogènes des anthères et des embryons immatures chez le Blé

J'AITI F.¹, BENLHABIB O.², BAAZIZ M.³, EL HADRAMI I.^{1*}

Laboratoire de Physiologie Végétale¹ et Laboratoire de Biochimie³, Département de Biologie, Faculté des Sciences-Semlalia, BP. S15, 40 001 Marrakech-Maroc. Laboratoire de Cytogénétique et de Culture de Tissus, IAV Hassan II, Rabat-Maroc² (* pour toute correspondance)

Dans les coutumes alimentaires marocaines, le pain constitue une denrée indispensable préparée essentiellement à base de blé et d'orge. Le blé (*Triticum durum* ou *T. aestivum*), dont la production est fluctuante, occupe la deuxième place après l'orge. L'utilisation de variétés adaptées aux stress biotiques et abiotiques (pluviométrie, température extrême, maladies, ravageurs...) est donc d'une importance certaine pour la céréaliculture. Plusieurs programmes de sélection et d'amélioration sont actuellement en cours. Ils reposent essentiellement sur les méthodes classiques et visent l'intégration des outils biotechnologiques. En effet, la maîtrise des techniques de production *in vitro* de plantes chlorophylliennes haploïdes (cultures anthères) ou diploïdes (cultures d'embryons immatures) offre différentes possibilités aux sélectionneurs. Pour cela, un travail a été réalisé dans le cadre de notre programme de recherche qui a pour objectif l'adaptation de ces deux techniques aux variétés marocaines. Aussi, avons nous relevé que la réponse des anthères et des embryons immatures à la culture *in vitro* est fortement liée aux génotypes. De plus, les variétés les plus androgènes ne sont pas forcément les plus réactives en culture d'embryons zygotiques. Tel est le cas de la variété Saada (blé tendre) qui produit des plantes haploïdes chlorophylliennes et qui se montre totalement récalcitrante pour la régénération de plantes diploïdes. Le génotype Anouar (blé dur) a également donné 100 % de cals embryogènes et organogènes en culture d'embryons zygotiques et ne présente qu'une réponse modérée vis-à-vis de la culture anthères. Ceci laisse supposer l'existence d'une différence dans le déterminisme génétique de l'embryogenèse somatique et gamétique. La réactivité ou la récalcitrance d'un génotype est donc sous contrôle génétique. Néanmoins, l'impact des conditions de culture et de différents traitements du matériel végétal contribuent pour une large part à cette même réactivité et/ou récalcitrance des variétés. En effet, en culture d'embryons immatures, la récalcitrance de plusieurs variétés, concernant la régénération de plantes, a été levée par l'utilisation de plusieurs substances, entre autres, un inhibiteur de l'action de l'éthylène (AgNO₃). Ainsi, l'incorporation de nitrate d'argent dans le milieu d'induction a favorisé, dans nos conditions expérimentales, la formation de cals morphogènes chez les variétés Cocorit, Marzak et Saada qui ne produisaient aucune plante sur le milieu

témoin (J'aiti et al., 1997). De même, le passage direct d'un milieu d'induction (2 mg/l de 2,4-D) à un milieu de régénération sans hormones a amélioré significativement le nombre de plantes vertes produites chez les deux espèces de blé. En culture anthères, certaines variétés telles que Isly et Cocorit ne présentaient aucune capacité embryogène sur les milieux habituellement utilisés. Cependant, l'utilisation de ces mêmes milieux conditionnés par les ovaires a permis la production de cals et d'embryons haploïdes à partir des anthères de ces génotypes (J'aiti et al., 1996). Parallèlement à ces modifications de conditions de culture et à cette variabilité génotypique relevée, une étude biochimique a été réalisée pour déterminer le degré d'implication de certains paramètres biochimiques telles que les protéines totales, les peroxydases et les estérases dans la réactivité ou la récalcitrance des anthères et des embryons zygotiques. Ainsi, il a été noté que la compétence des embryons à produire des cals morphogènes paraît liée à leur capacité de biosynthèse protéique et d'activation des systèmes enzymatiques, peroxydasiques et estérasiques (J'aiti et al., 1996). De même, il a été remarqué que les anthères les plus réactives se caractérisent par des activités peroxydasiques et estérasiques élevées. L'importance et l'interaction de ces paramètres génotypiques et biochimiques dans la réactivité des embryons immatures et des anthères sera discutée.

Mots clés

blé, embryogenèse somatique, organogenèse, marqueurs biochimiques, anthères, embryons immatures.

Remerciements

Ce travail est réalisé dans le cadre du Fonds Francophone de la Recherche « Jeune Équipe de Recherche associée à l'AUELF-UREF, JER 3008 » et dans le cadre d'une collaboration en Biotechnologie entre l'IAV Hassan II et l'ICARDA. Il bénéficie également d'une bourse de recherche de la FIS (FIS, D/1937-2).

Bibliographie

1. J'AITI F., BENLHABIB O., EL HADRAMI I. (1997). Actes Inst. Agro.Vet., 17 : 34-42.
2. J'AITI F., BENLHABIB O., BAAZIZ M., EL HADRAMI I., NACHIT M. (1996). Actes de la 3^e Réunion du Réseau SEWANA, Recherche Intégrée sur le blé (sous presse).
3. J'AITI F., BENLHABIB O., BAAZIZ M., EL HADRAMI I. (1996). Actes des Journées Scientifiques sur l'amélioration du blé, Oujda 25-27 Avril 1996 (sous presse).

D25 : Polymorphisme hétérochromatique intervariétal chez le blé dur, et chez le blé tendre cultivés en Algérie

KHALFALLAH N., HAMOUDA D.

Laboratoire d'Amélioration des plantes, Institut des Sciences de la Nature, Université de Constantine.
Alger

L'application de la technique du C-banding chez trois variétés de blé dur algérien, a révélé un polymorphisme hétérochromatique entre ces trois variétés, notamment chez les chromosomes 1B, 2B, 3B et 4B. La variété Oued Zenati sélectionnée dans une population locale de la station de Guelma (plaines intérieures) est plus riche en hétérochromatine.

Les résultats de l'application de cette technique au blé tendre, sont discutés par rapport à la variété témoin Chinese Spring.

D26 : Étude de la diversité allélique des oméga-gliadines de la zone D, en relation avec les tests de technologie appréciant la valeur d'utilisation du blé tendre (*Triticum aestivum*. L).

KHELIFI D.¹, BRANLARD G.²

¹ Institut des Sciences de la Nature, Université de Constantine, 25000 Constantine, 25000 Constantine, Algérie.

² I.N.R.A., Domaine de Crouelle, 63039 Clermont-Ferrand, France.

La diversité des oméga-gliadines de la zone D a été analysée pour 169 blés tendres provenant de 17 pays. Douze bandes de mobilité différente ont été répertoriées. La localisation chromosomique de chacune des bandes a été réalisée grâce à l'analyse des lignées nullitétrasomiques et substituées. Le calcul des corrélations interbandes révèle plusieurs groupes de bandes constitués de deux ou trois bandes. Cinq, sept et trois allèles ont été identifiés pour les chromosomes 1As, 1Bs et 1Ds respectivement.

La relation entre la diversité allélique des oméga-gliadines et la qualité technologique a été étudiée. Les résultats de l'influence de ces protéines sur la qualité montrent nettement que certaines protéines ont un effet significatif dans l'expression des caractéristiques rhéologiques de la pâte.

Ces protéines s'avèrent de bons marqueurs de la qualité, d'autant plus qu'elles peuvent être détectées à un stade précoce de la sélection.

D27 : Collecte et évaluation des ressources locales de blé dur pour la tolérance à la sécheresse : prospections en zones Bour et Oasis marocaines

LAMINI H.^{1,2}, EL MEKKAOUI M.¹, BAHRI H.¹, EL JAAFARI S.²

(1) Département d'Agronomie et Amélioration des Plantes, École Nationale d'Agriculture, Meknès.

MAROC (2) Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl, Meknès, MAROC

L'extension du front de la sécheresse dans les zones particulièrement exposées aux aléas climatiques, les rapides transformations socio-économiques au Maroc, ont provoqué la disparition d'un nombre relativement important de cultivars de blés traditionnels. Ces cultivars peuvent constituer une source de variabilité importante utilisable dans l'amélioration génétique du blé. La mobilisation de ces ressources génétiques pourrait 1) relever le plafond d'amélioration génétique, 2) abaisser la vulnérabilité aux stress biotiques et abiotiques et 3) introduire des voies de développement et d'adaptation écologique nouvelles. Une meilleure connaissance des mécanismes de tolérance de ces blés et l'identification de paramètres morpho-physiologiques correspondant est nécessaire pour une utilisation efficace de ces

ressources génétiques pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez le blé. Une série de prospections a été réalisée dans des zones Bour et dans des Oasis du Maroc : Settat, El Jadida, Taza, Sidi Kacem et Tafilalet. Parmi les cultivars collectés, 24 géotypes ont fait l'objet d'une description agro-morphologique (forme et la longueur de l'épi et du grain, la hauteur de la paille la fertilité des épillets et le poids de mille grains) et d'une caractérisation physiologique pour leur tolérance au déficit hydrique. Deux variétés améliorées ont été utilisées comme référence : Sarif (à adaptation large) et Isly (à adaptation spécifique). Les paramètres physiologiques mesurés concernent le statut hydrique de la plante (teneur relative en eau, potentiel hydrique), son activité photosynthétique (fluorescence chlorophyllienne, échanges gazeux) et son rendement en biomasse. Une large variabilité a été trouvée pour ces paramètres au sein du matériel collecté. Un indice de sensibilité vis à vis de la sécheresse a été calculé sur base de rendement en biomasse en conditions de déficit hydrique rapportée au témoin en conditions favorables d'alimentation en eau. Cet indice a permis de classer les différents cultivars en fonction de leur niveau de tolérance, les autres paramètres physiologiques ont été utilisés dans une approche analytique visant à comprendre les mécanismes de tolérance développés par ces cultivars et l'identification de critères d'évaluation. Douze cultivars se sont révélés plus tolérants que les 2 variétés témoin Sarif et Isly. Les possibilités d'utilisation de ces ressources locales pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse chez le blé sont discutées.

D28 : Étude de la structure du complexe d'espèces des sétaires et de la diversité du millet (*S. italica*) et de son ancêtre sauvage (*S. viridis*) par des marqueurs AFLP

LE THIERRY D'ENNEQUIN M., PANAUD O., SILJAK-YAKOVLEV S., SARR A.

Laboratoire d'Évolution et Systématique, URA CNRS 2154, Université Paris XI, Bât. 362. 91405 ORSAY Cedex FRANCE.

Le millet, *Setaria italica*, est une céréale d'importance majeure en Chine qui a été domestiquée à partir de son ancêtre sauvage *Setaria viridis*. Ces deux espèces qui forment le pool primaire du complexe des sétaires ont en commun l'annualité, la diploïdie ($2n=18$) et l'autogamie. L'étude de la domestication et de la structure des complexes d'espèces permet d'apporter des connaissances indispensables à l'utilisation des ressources génétiques. La détermination du nombre chromosomique et l'évaluation de la quantité d'ADN de 15 espèces du complexe des sétaires ont permis de mettre en évidence la présence de trois niveaux de ploïdie ainsi que d'importantes variations interspécifiques de la taille du génome. De plus le millet, dont le contenu en ADN a été évalué à 1 pg, se révèle être le plus petit génome avec le riz parmi les céréales.

D'après des données archéologiques, la domestication du millet remonte à 5000 ans avant notre ère. De nombreux auteurs s'accordent à dire qu'il y a eu deux domestications distinctes, une en Chine et une autre plus récente (2000 ans avant notre ère) en Europe. Cependant d'autres hypothèses comme celle d'une domestication unique en Chine suivie d'une diffusion vers l'Europe ou plus récemment celle de l'existence d'un troisième centre de domestication dans une région située entre l'Afghanistan et le Liban ont été développées. L'ensemble de ces travaux est basé sur des études de diversité par des marqueurs morphologiques ou isozymiques. Les objectifs de notre étude ont été d'une part d'évaluer la diversité du pool primaire du complexe des sétaires par des marqueurs moléculaires de type AFLP et d'autre part d'identifier les centres de domestication possible du millet. Ces données confrontées aux données acquises avec les autres types de marqueurs permettent de valider certaines hypothèses et témoignent de l'efficacité des marqueurs AFLP pour l'évaluation de la diversité génétique.

D29 : Étude de la variabilité génétique pour l'aptitude à l'androgenèse dans une collection française de blé dur (*Triticum durum* desf.)

MIHAMOU A.Z., PICARD E., BELABED A., WERTHEIMER D.¹

Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire d'amélioration et de production végétales.
60000 Oujda Maroc **Laboratoire de Morphogenèse Végétale Expérimentale, Bat 360 F 91405 Orsay
France

Le but de ce travail est d'étudier la variabilité génétique pour l'aptitude à l'androgenèse *in vitro* et surtout pour la production de plante chlorophylliennes de blé dur.

Chez cette espèce le taux de régénérations de plantes chlorophylliennes par culture d'anthers est très faible. Par contre les taux de régénérations de plantes albinos et de racines restent assez élevés. La collection étudiée comprend 101 génotypes -fournie par le GAE (Société Française, Essonne) dont un seul génotype fourni par l'ICARDA. Cette étude nous a permis de régénérer une cinquantaine de plantes chlorophylliennes chez 18 génotypes dont 4 lignées fixées (MONDUR, EURODUR, MEGADUR, PRIMADUR). Ces résultats comptent parmi les meilleurs obtenus chez cette espèce, par cette méthode.

Les paramètres qui ont été utilisés pour étudier cette variabilité sont les pourcentages d'épis embryogènes, d'embryons, de régénérations chlorophylliennes, de régénérations albinos et de régénérations racinaires. Pour chaque paramètre, les meilleurs génotypes ne sont toujours pas les mêmes. La corrélation entre ces différents paramètres. L'effet génotypique reste significatif pour tous les paramètres étudiés sauf pour le pourcentage de régénérations chlorophylliennes. Ceci s'explique par la faiblesse de ce pourcentage. Le meilleur pourcentage de régénérations vertes est de l'ordre de 1,2 %.

Mots clés : Androgenèse *in vitro*, blé dur, variabilité génétique.

D30 : La réponse *in vitro* de 11 génotypes de blé d'hiver au traitement avec NaCl

MORARU I., RĂDUCANU F., ZGLIMBEA ROMULUS G.

Institut de Recherche pour Céréales et Plantes Techniques, Fundulea, Roumanie.

L'excès de salinité du terrain a beaucoup d'implications à l'intérieur du monde vivant, imposant d'effectuer des études pour l'amélioration du niveau de tolérance des plantes cultivées à la salinité. Des résultats récents concernant la possibilité de tester et de sélectionner *in vitro* pour ce type de résistance ont été rapportés chez le sorgho (WASKOM et col., 1990), la betterave (FREYTAG et col., 1990), le lin (MC HUGHEN, 1987), le blé (DE LEON, 1995). Le but de notre expérimentation a été la recherche des possibilités de tests *in vitro*, comme première étape, conduisant à un procédé de sélection au niveau des cals pour une meilleure résistance à la salinité chez des génotypes de blé. Ont été analysés 11 génotypes de blé d'hiver (du Laboratoire d'amélioration du blé, IRCPT, Fundulea). Les cultures *in vitro* ont été initiées à partir d'embryons immatures (1-1,5 mm longueur) placés sur le milieu MURASHIGE et SKOOG (1962) supplémenté avec 2 mg/l 2,4D, 0,5 mg/l KN, pH = 5,8 et incubées à 27°C et à

l'obscurité. L'agent de sélection (NaCl) a été introduit dans le milieu de culture à deux concentrations : 4 g/l et 6 g/l respectivement. L'analyse de variance concernant la réponse *in vitro* des 11 génotypes de blé d'hiver au traitement avec NaCl montre que pour le poids des cals ont été trouvés des valeurs du facteur F significatives seulement pour les génotypes et les traitements, et non pour l'interaction génotype x traitement. La plus forte réaction aux traitements appliqués a été observé chez le génotype Rapid, avec une réduction en pourcentage significative du poids des cals (56,27 %- V_1 et 66,33 %- V_2 respectivement). Il a été suivi par Fundulea 29 (50,35 % et 57,74 % respectivement). Pour les génotypes Fundulea 4 et Alex, on a observé que les traitements n'ont pas influencé négativement l'évolution des cals (les réductions du poids des cals ne sont pas statistiquement différentes). On a constaté qu'entre le poids initial et le poids final des cals (après les traitements avec NaCl) il n'existait aucune corrélation significative statistiquement ($r = 0,207$; $r = 0,464$ respectivement). Cela suggère que le poids initial des cals étudiés n'a pas d'influence sur leur réponse au traitement au NaCl. Le comportement des génotypes *in vitro* est en rapport avec leurs caractéristiques génétiques. Cette affirmation est corroborée par le fait que chez le témoin non traité il existe une corrélation positive significative entre poids initial et final ($r = 0,683$). L'expérimentation a été complétée aussi avec les résultats obtenus au niveau des plantules à la concentration de 6 g/l NaCl. Ont été effectuées l'analyse de variance concernant la réaction des génotypes à cette concentration et l'étude des corrélations entre les résultats obtenus *in vitro* (poids du cal) et *in vivo* (longueur de la plantule).

D31 : Utilisation de lignées isogéniques en sélection du blé assistée par des marqueurs moléculaires : techniques et approches

NAJIMI B., EL JAAFARI S.

Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismaïl, Meknès, MAROC.

Des lignées isogéniques du blé sont développées à l'INRA de Meknès et caractérisées pour leur résistance à quatre principales maladies. Ces lignées sont issues de croisements entre les principales variétés cultivées au Maroc (Nasma, Marchouch, Kanz et Achar) et des sources de résistance aux maladies citées, suivies d'une série de croisements retours au parent récurrent que constitue la variété cultivée. La proportion minimale du génome en commun étant de 97 %. Ces lignées sont actuellement au cours d'évaluation, au Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes de la Faculté des Sciences de Meknès, pour des mécanismes de tolérance à la sécheresse (ajustement osmotique, photosynthèse, régulations stomatiques...) présentent des différences concernant des caractères morphophysologiques potentiellement impliqués dans la tolérance à la sécheresse. Dans le cadre d'une bourse d'excellence de l'AUPELF-UREF, nous visons développer des marqueurs moléculaires pour assister la sélection de variétés à résistance multiple aux maladies et tolérantes vis-à-vis de la sécheresse. Cet aspect moléculaire du programme sera réalisé dans un premier temps à la Station d'Amélioration des Plantes de Gembloux selon trois voies :

- La technique la plus efficace pour analyser des lignées isogéniques est l'AFLP : c'est une technique récente mais efficace consistant à la digestion de l'ADN par deux enzymes suivie de ligation d'adaptateurs et d'amplification d'ADN. Cela permet de générer 50 à 100 fragments d'ADN localisés sur des endroits différents.
- Les microsatellites qui commencent à être disponibles chez le blé.

- Les marqueurs RFLP dont une série a été isolée et cartographiée à la Station d'Amélioration des Plantes de Gembloux.

Nous rechercherons ensuite, les corrélations entre le polymorphisme des marqueurs moléculaires sur les lignées et parents utilisés et leurs réponses morphophysiologiques au stress étudié.

Remerciements

- Dr. M. Jlibene de l'INRA-Meknès pour avoir mis à notre disposition les lignées isogéniques.
- Dr. J.-M. Jacquemin de la Station d'Amélioration des Plantes de Gembloux, pour avoir dirigé l'élaboration de l'approche moléculaire.

D32 : Le rôle de l'organisation génétique du syndrome de domestication au sein du pool primaire du mil (*Pennisetum sp.*)

PONCET V., ROBERT T., LAMY F., SARR A.

Laboratoire d'Évolution et Systématique, URA CNRS 2154, Université Paris XI, Bât. 362. 91405 ORSAY Cedex FRANCE.

Le mil cultivé (*Pennisetum glaucum* sp. *glaucum*) et la forme sauvage dont il serait issu (*Pennisetum glaucum* sp. *monodii*) sont encore parfois trouvés en situation de sympatrie. L'absence de barrières reproductives strictes et un mode de reproduction préférentiellement allogame facilitent les flux de gènes entre les deux populations qui conservent pourtant leurs caractéristiques phénotypiques. Différents mécanismes biologiques ont été proposés pour expliquer cette situation. Le rôle de l'organisation sur les chromosomes des gènes déterminant les différences morphologiques entre la forme sauvage et la forme cultivée (caractères constituant le « syndrome de domestication ») est ici considéré. Un regard particulier est porté sur la structure de l'épillet, élément clé du syndrome de domestication. La construction d'une carte génétique comportant des marqueurs de type RFLP et AFLP (marqueurs dérivés de la PCR) a permis d'affecter aux groupes de liaisons 6 et 7 des QTL (quantitative trait locus) impliqués dans l'expression des différences cultivé/sauvage de l'épillet. D'autre part, il apparaît que les différences au niveau de l'architecture générale, du développement et de la floraison sont déterminées par une portion du génome relativement restreinte. Cela pourrait traduire le fait que des facteurs génétiques (effets pléiotropiques) ont été la cible de la sélection lors du processus de domestication. L'étude comparée de différents génomes de céréales (maïs, sorgho, riz, millet) pour ces régions permettra de tester leur homologie et de comparer en particulier leur organisation pour des espèces ayant des modes de reproduction différents (allogames et autogames).

Cette organisation génétique resserrée du syndrome permet d'envisager des stratégies d'introgession massive dans le pool cultivé de la variabilité adaptative des sauvages grâce à un maintien efficace du type cultivé au cours des rétrocroisements et une introgression des allèles sauvages sur une large partie du génome.

D33 : Polymorphisme des accessions de sorgho (*Sorghum bicolor*)

RAIES A.¹, ELFENDRI-JARRAYA N.^{1,2}, TRIGUI N.³, CHIBANI F.⁴, CHALBI N.², KALLEL H.¹

(1) Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences de Tunis, 2092 El-Manar II Tunis, Tunisie. (2) Laboratoire de Génétique et de Biométrie, Faculté des Sciences de Tunis, Tunis (3) Laboratoire de Génétique, Faculté des Sciences de Sfax, B.P. W, 3080, Sfax, Tunisie. (4) Unité de Biotechnologie Végétale et de Ressource Génétique, INRST, B.P. 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie.

Dans le présent travail, nous avons essayé de mettre en évidence la variabilité morphologique des accessions de Sorgho (*Sorghum bicolor* L.) en Tunisie. Cette variabilité a pu être analysée dès les premiers stades du développement de la plante au moyen d'un test précoce. L'étude des caractères séparés a été effectuée par l'analyse de la variance puis complétée par une comparaison des moyennes prises deux à deux ainsi que par le calcul de la plus petite différence significative (PPDS) entre les moyennes pour chaque caractère. L'étendue des différences significatives est ainsi représentée. Pour mieux estimer la ressemblance ou la dissemblance entre les accessions étudiées, nous avons adopté la méthode de calcul des indices de proximité basée sur les différents groupes obtenus par la méthode de DUNCAN. La représentation schématique des indices de proximité est traduite sous forme de dendrogramme. Au stade deux semaines, la diversité génétique entre les accessions est encore peu marquée. Celle-ci devient plus nette au stade un mois. En effet les accessions se regroupent d'une façon plus homogène selon leur utilisation ou en fonction de leur répartition géographique. Cette étude nous a montré que généralement, c'est le sorgho fourrage et plus particulièrement celui du Cap-Bon qui représente les moyennes les plus fortes. Alors que les moyennes les plus faibles sont rencontrées chez les accessions de sorgho grain.

Malgré les avantages que présente cette céréale pour l'alimentation animale et humaine ainsi que pour l'industrie, sa culture reste assez limitée dans notre pays. Cette évaluation préliminaire est certainement d'un grand apport pour la valorisation agricole de nos ressources génétiques du Sorgho.

D34 : Caractérisation moléculaire de cals embryogènes de deux cultivars de Palmier dattier, Deglet Nour et Takerboucht en vue de leur exploitation en création variétale

SAKA H.

Laboratoire de Physiologie végétale -CRP Mahdi Boualem -BP 37 -INRA, Algérie

La voie de l'embryogenèse somatique est utilisée afin d'obtenir du cal de deux cultivars de palmier dattier, Deglet Nour et Takerboucht et ce à partir de différents tissus de rejet. Notre objectif étant d'obtenir des protoplastes de palmier dattier à partir de cal embryogène, il était primordial dans un premier temps d'identifier des marqueurs permettant une discrimination des deux cultivars au stade cal embryogène. Une caractérisation moléculaire est réalisée par PCR/RAPD en utilisant 60 amorces décimères arbitraires. Cette technique a permis de sélectionner 12 amorces révélant un polymorphisme. Ces marqueurs RAPD, fragments polymorphes générés, de type présence ou absence permettront de distinguer les hétérofusiones des autofusions lors de fusions somatiques des deux cultivars.

D35 : Déterminisme génétique de la régénération chez le tournesol

SARRAFI A.

I.N.P.-E.N.S.A.T, Laboratoire de biotechnologie et amélioration des plantes. Unité associée à l'I.N.R.A.
145, Avenue de Muret 31076 Toulouse Cedex FRANCE. Tel et fax : +(0)5.62.13.65.64

La régénération des plantes par culture *in vitro* est généralement obtenue de façon spécifique, mettant en évidence une forte composante génétique. C'est le cas chez le tournesol où la production des plantes ou des embryons par l'organogenèse ou embryogenèse somatique est à ce jour limitée à un nombre restreint de génotypes. Par ailleurs, chez cette espèce, l'obtention des embryons somatiques et la connaissance du déterminisme génétique de la régénération a un intérêt considérable pour la réalisation des expérimentations en vue du déterminisme des mécanismes cellulaires et moléculaires de la régénération ou de la transformation par génie génétique. Nous avons donc commencé, depuis 1994, à mener des études sur les facteurs génétiques impliqués dans le processus en utilisant un matériel génétique varié, disponible à l'ENSAT ou crée pour les travaux de l'amélioration de cette espèce à l'INRA. Les expérimentations et les résultats les plus importants obtenus sont les suivants : l'étude des lignées alloplasmiques (deux lignées ayant le même noyau et des cytoplasmes différents) nous a permis de comparer quelques paramètres organogénétiques comme, par exemple, le taux de bourgeons formés par explant mis en culture à partir des cotylédons chez des génotypes différents, sur leur propre cytoplasme et celui d'espèces différentes. Nous avons pu ainsi déterminer l'effet favorable des facteurs génétiques et l'interaction nucléo-cytoplasmique de ce matériel en organogenèse. Nous remarquons un effet favorable ou défavorable de certains cytoplasmes concernant le nombre de bourgeons formés par explant. Soixante-dix lignées F7 provenant du croisement entre deux génotypes de tournesol ainsi que leurs parents ont été étudiées pour leur aptitude à la régénération *in vitro* par organogenèse à partir de cotylédons. Les parents ont également été évalués pour leur aptitude à l'embryogenèse somatique à partir des couches épidermiques et par la culture des protoplastes d'hypocotyles. La régénération *in vitro* a permis de déterminer l'influence du facteur génétique sur organogenèse. Les résultats montrent que le génotype RHA-266 a généralement une aptitude plus importante aux paramètres de l'organogenèse que celle de la lignée PAC-2. La lignée F7 'LR-19' est la plus performante pour le pourcentage de cotylédons organogènes et le nombre de bourgeons par explant, elle possède des valeurs supérieures à celles du meilleur parent (RHA-266). Ce qui peut s'expliquer par l'accumulation d'allèles favorables à la régénération provenant des deux parents. L'embryogenèse somatique, à partir des couches épidermiques, semble être importante chez le génotype PAC-2. Pour ce qui concerne la culture de protoplastes, le génotype RHA-266 est plus performant que le génotype PAC-2. L'étude des paramètres de organogenèse de 18 hybrides F1 et de leurs 9 parents (6 mâles et 3 femelles) dans un plan factoriel démontre une variabilité très importante chez le matériel étudié. Les valeurs significatives de l'aptitude générale à la combinaison obtenues pour la plupart des parents mettent en évidence l'existence d'un contrôle génétique additif pour les paramètres de organogenèse chez le matériel étudié. L'aptitude spécifique à la combinaison pour les paramètres de organogenèse chez les hybrides F1 montre également des cas positifs et significatifs en raison de l'effet dominant des gènes contrôlant ces paramètres. Dans une autre expérimentation, par l'étude de 10 lignées de tournesol et de leurs 25 hybrides F1, nous avons montré l'importance de la variabilité génétique et des aptitudes générales et spécifiques à la combinaison des lignées et des F1 pour les paramètres de organogenèse étudiés. Les résultats de ces deux dernières expérimentations basées sur la variabilité génétique et l'aptitude générale à la combinaison montrent que quelques lignées sélectionnées peuvent transférer cette aptitude à leur descendance et améliorer ainsi la performance des lignées productives mais récalcitrantes à l'organogenèse.

D36 : Première mise en évidence du déterminisme sexuel chez le palmier dattier

SILJAK-YAKOVLEV S.¹, BENMALEK S.², CERBAH M.¹, COBA DE LA PENA T.³,
BOUNAGA N.², BROWN S.³, SARR A.¹

¹ Laboratoire d'Évolution et Systématique, URA CNRS 2154, Université Paris XI, Bât. 362. 91405 ORSAY Cedex, France

² Centre de Recherche Scientifique et Technologique sur les Régions Arides, Laboratoire de Botanique. BP 119, 16000 ALGER-Gare, Algérie

³ Institut des Sciences Végétales, Cytométrie, CNRS UP 40, 91198 Gif-sur-Yvette, France

Le Palmier dattier joue un rôle écologique et économique majeur dans les agrosystèmes des zones arides. En raison de la dioécie et de la durée de la maturation sexuelle, l'amélioration génétique de cette espèce n'a pas suivi les formidables progrès enregistrés chez d'autres espèces. En particulier, les ressources génétiques disponibles sont peu ou pas exploitées, les variétés étant essentiellement des clones femelles identifiés pour leur potentiel de production et diffusés sur une grande échelle. Cette uniformité génétique engendre une grande vulnérabilité vis-à-vis des stress biotiques et abiotiques. Ainsi depuis quelques années une épidémie de fusariose (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) dévaste les principales palmeraies du Maghreb. La sélection de variétés résistantes s'appuyant sur l'exploitation de la diversité génétique issue de croisements contrôlés s'impose, mais les contraintes biologiques rendent pour l'instant cette démarche réthibitoire (5 à 10 ans pour distinguer les sexes des descendances et effectuer la sélection).

Le Palmier dattier fait partie des espèces dioïques chez lesquelles le déterminisme du sexe était encore mal connu. Vu l'initiation reproductive tardive (5 à 10 ans pour la première floraison) la détermination précoce du sexe peut avoir des retombées importantes dans la relance des schémas d'amélioration génétique.

Dans le cadre de nos recherches sur l'évolution des génomes, nous nous sommes donc intéressés au déterminisme sexuel chez le Palmier dattier, par une approche cytogénétique (fluorochrome banding des séquences riches en bases GC).

La méthodologie mise au point permet l'identification précoce du sexe (stade germination), ce qui ouvre de larges perspectives pour l'exploitation de la diversité génétique au travers de croisements contrôlés. En effet, les sélectionneurs pourront dès le stade jeune (et non plus après 10 ans) identifier des individus femelles ayant introgressé des gènes d'intérêt agronomique, comme des gènes de tolérance à des stress biotiques et abiotiques. En particulier, cette approche pourrait être appliquée à la création de variétés résistantes au bayoud, maladie dont la vaste diffusion est probablement associée à l'uniformité génétique des palmeraies.

D37 : Tests aux champs et identification isoenzymatique des plantations d'hybrides d'Eucalyptus (*E. urophylla*, *E. alba*) dans la forêt d'État de Pasirmayang, Jambi

UMBOH M.I.J., DURIADI D., NURJANAH N., YANI S., HUSEN A.

SouthEast Asian Regional Centre for Tropical Biology, JL Raya Tajur Km 6, Bogor, Indonésie :
télécopie : +62 251 32 68 51

L'utilisation du bois d'Eucalyptus comme matière première pour l'industrie de la pâte à papier est en nette progression. Cependant, bien qu'originaires des régions de l'Est indonésien (les îles Sumba, Timor and Flores) et du Nord australien, certaines espèces d'Eucalyptus ne s'adaptent pas au climat de ces régions où se concentrent les industries de la pâte à papier indonésiennes. Ainsi, des essais de plantations d'hybrides d'Eucalyptus ont été effectués dans des zones forestières de l'est d'Indonésie (PT Barito Pacific Timber), notamment à Pasirmayang, Jambi. Ce travail a pour principaux objectifs l'étude de la croissance et l'identification des hybrides (*E. urophylla* et *E. alba*) et de leurs parents dans des plantations, ainsi que la recherche des meilleures combinaisons espèces/varieties d'Eucalyptus pour leur haut potentiel de production dans des plantations à Sumatra et à d'autres endroits industrialisés. Les explants utilisés proviennent de germinations âgées de 2 mois, obtenues à partir de pollinisation contrôlée de *E. urophylla* (X) et de *E. alba* (C), et de leurs parents respectifs. Des essais sur 972 plants issus de 4 hybrides (*E. urophylla* et *E. alba*) et de leur plante mère ont été effectués dans 3 blocs. Les plants ont été plantés à une distance de 3 x 6 m. Parés 12 semaines de plantation, on constate une influence significative du facteur génotype/clone sur la croissance élevée de 3 clones hybrides et de leur plante mère. L'identification de ces clones peut être complétée par une étude morphologique effectuée sur des feuilles et des tiges des arbres âgés d'un an. De plus, l'identification de génotypes à travers l'analyse des estérases et des peroxydases a montré une variation parmi les clones hybrides et parentaux, notamment le clone hybride Ua₅ présentant des caractères génétiques spécifiques et le clone Ea₁ montrant des caractères génétiques du clone hybride Ua₁.