

PARTIE V

Les étiquetages et repérages moléculaires

39

Utilisation des RAPD en cartographie génétique et pour l'analyse phénétique. Application à l'étude du genre *Petunia*

D. PELTIER¹, A. BERVILLÉ², H. DULIEU¹

1. Université de Bourgogne et INRA, BV 1540, 21034 Dijon, France.

2. INRA-ENSAM, 2, place P. Viala, 34060 Montpellier, France.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) [13] permet, à partir d'un ADN matrice et de 2 amorces oligonucléotidiques, d'augmenter de manière quasi exponentielle le nombre de fragments limités par des séquences homologues aux amorces dans l'ADN matrice. On obtient alors l'amplification des fragments encadrés par les amorces. Lorsqu'on utilise une seule amorce de petite taille (8 à 12 bases), dont la séquence est choisie au hasard tout en respectant certaines règles quant à sa composition (contenu en GC), on peut constater, après PCR, l'amplification de fragments à partir d'un ADN génomique. Le nombre et les séquences des fragments amplifiés varient selon l'amorce utilisée. L'amplification de l'ADN génomique de deux génotypes différents, avec une même amorce, peut révéler des variations se traduisant par la présence ou l'absence d'un fragment donné selon le génotype. On dispose alors d'un fragment d'ADN polymorphe amplifié au hasard ou RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) [22]. Ce RAPD représente un marqueur anonyme potentiel.

Les marqueurs RAPD sont traités comme des marqueurs dominants [23] ; la présence d'un fragment est considérée comme allèle de son absence. Dans ce cas, le génotype d'un hétérozygote se traduit par la présence d'un fragment amplifié ; il est indiscernable de celui d'un homozygote pour la présence du fragment. On peut cependant supposer l'existence de fragments allèles, à la suite d'une délétion par exemple, mais ce

type de situation semble rare. D'un point de vue pratique, ce type de marqueur se caractérise par une plus grande facilité de mise en évidence par rapport aux marqueurs de type RFLP ou microsatellites.

Les marqueurs RAPD ont permis l'établissement de cartes génétiques pour différentes espèces (*Arabidopsis* [12], Luzerne [6]) et la réalisation d'études de diversité génétique [18].

Petunia hybrida est une création horticole par hybridation interspécifique relativement jeune, puisque son origine remonte à 170 ans. Cette espèce a fait l'objet de nombreux travaux en génétique et biologie cellulaire et moléculaire [4, 8]. Son choix se justifie, d'une part, par la grande variabilité existant dans cette espèce pour des caractères morphologiques, la réponse aux différentes vitrotechniques, et, d'autre part, son cycle de reproduction court et sa facilité de culture. Les travaux réalisés ont permis l'identification de 97 gènes affectant des caractères morphologiques [5] ; l'utilisation conjointe de la cytogénétique et de la génétique a permis de regrouper ces marqueurs sur les 7 chromosomes de cette espèce [5]. L'ordre dans les groupes n'est pas déterminé à quelques exceptions près. La réalisation d'une carte ordonnée avec les marqueurs morphologiques nécessite un gros investissement en termes de temps et de matériel. Nous avons donc réalisé une carte génétique en utilisant des marqueurs moléculaires de type RAPD.

La taxonomie du genre *Petunia* est réalisée sur la base de caractères morphologiques. La première, réalisée par Fries [7], est basée sur la couleur de la corolle (blanche ou rouge) et sur sa morphologie. Plus récemment, Smith et Downs [15] réalisèrent une taxonomie en se basant sur la morphologie du calice et sur le type herbacé ou arbustif des espèces. Enfin Wijsman [20, 2], en se basant sur le caryotype des différentes espèces et la compatibilité de celle-ci lors de la réalisation de croisements, proposa une séparation du genre *Petunia* en un genre *Stimoryne* regroupant les espèces à $2n = 14$ et un genre *Petunia* regroupant les espèces à $2n = 18$. Nous avons utilisé les RAPD et l'analyse phénétique afin d'étudier la taxonomie du genre *Petunia* sur la base de marqueurs moléculaires. Nous avons par ailleurs étudié un ensemble de lignées de *P. hybrida* afin de déterminer les relations entre cette espèce et les espèces ancestrales apparentées.

Nous avons cherché les fragments cartographiés dans les espèces ancestrales apparentées à *P. hybrida* afin de préciser l'origine de la variabilité existant dans cette espèce et d'établir éventuellement son origine introgressive. Nous avons utilisé un ensemble de 7 espèces du genre *Petunia* et de 10 lignées de *P. hybrida* pour réaliser des amplifications d'ADN. La coïncidence de taille entre deux fragments amplifiés n'est pas une preuve de l'homologie de leurs séquences. Nous avons donc cherché à établir les différences éventuelles entre une analyse de la diversité basée sur un relevé de fragments caractérisés par leurs tailles ou basée sur un relevé des fragments présentant des séquences homologues. Ces relevés ont servi de base au calcul de matrices de distances génétiques. Les matrices obtenues ont permis de tracer des phénogrammes que nous comparons.

Réalisation d'une cartographie génétique de *P. hybrida*

Matériel et méthodes

Nous avons choisi les lignées St40 et Tlv1 pour réaliser la cartographie. Chaque chromosome de ces deux lignées porte un locus identifié, déterminant un caractère morpho-

logique. La composition allélique de ces lignées pour ces marqueurs permet de déterminer dans un rétrocroisement le génotype de chaque individu. De ce fait, il est possible d'affecter les groupes de liaison aux chromosomes par coségrégation. Cent individus d'un croisement (St40 × Tlv1) × Tlv1 ont été utilisés pour réaliser l'analyse de ségrégation. Les extractions d'ADN total ont été réalisées selon Bernatzky et Tanksley [2] ; l'étape de purification sur gradient de CsCl n'a pas été réalisée. Les mêmes extraits ont été utilisés tout au long des expériences pour les individus ségrégeants. Deux extractions différentes d'ADN des parents et de l'hybride ont été utilisées, l'une pour la recherche de RAPD, l'autre pour la réalisation de témoins lors des analyses de ségrégation. Nous avons employé 80 amorces fournies par la société Operon technologies (kits H, J, V, U) pour rechercher des RAPD spécifiques de St40. Les conditions d'amplification utilisées sont les suivantes :

Tris-HCl pH 8,8 : 0,067 M
MgCl₂ : 0,003 M
(NH₄)₂SO₄ : 0,0166 M
amorce : 4 µM
dNTPs : 500 µM de chacun

Taq DNA polymérase (Boehringer) : 1,5 U

Chaque réaction est réalisée dans un volume de 25 µl avec 40 ng d'ADN génomique. Après ajout de 50 µl d'huile de paraffine, on effectue 30 répétitions d'un cycle 92 °C 1 mn ; 38 °C 1 mn ; 74 °C 1 mn 30 avec un appareil Biométra « triothermoblock ». Après amplification, 8 µl du milieu de réaction sont analysés, les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse 4 h à 100 V dans du tampon TAE 1X dans un gel d'agarose à 2,2 % (20 × 20 cm) puis colorés au bromure d'éthidium (Sigma). Le gel présente deux rangées de puits et deux séries de dépôts sont réalisées sur un même gel. Pour chaque amorce, chaque gel d'analyse des ségrégations intègre, comme témoins, des amplifications réalisées en même temps que l'amplification des ségrégeants, à partir de l'ADN de St40, de Tlv1 et de leur hybride. La compatibilité de la ségrégation 1 : 1 de chaque RAPD a été testée par calcul du χ^2 .

L'analyse des résultats a été réalisée en utilisant le logiciel Mapmaker 2.0 [10]. Un « Lod score » de 3,0 a été retenu comme seuil pour la détermination des groupes de liaisons. L'ordre des marqueurs dans les groupes est déterminé par analyse multipoints.

Résultats

Les 80 amorces testées (kits operon H, J, V, Q, U) ont généré 54 RAPD de St40 pouvant être suivis dans un backcross (St40 × Tlv1) × Tlv1). La ségrégation de 35 d'entre eux a été analysée. Chaque RAPD est identifié par la référence de l'amorce operon, suivie de la taille estimée du fragment. La carte génétique obtenue est présentée Figure 1. Six groupes de liaisons (soit 25 RAPD) sont rattachés par un marqueur morphologique à un chromosome ; un groupe de 8 marqueurs n'est pas affecté. Le chromosome IV n'est pas marqué et 2 RAPD ne sont rattachés à aucun autre marqueur. Cette carte couvre 269,2 cM avec une distance moyenne entre marqueurs de 8,2 cM.

La carte génétique de *Petunia hybrida* publiée dans « Genetic maps 1990 » [5] comprend 116 marqueurs affectés aux groupes de liaisons dont une centaine correspond à des gènes contrôlant des caractères morphologiques. Du fait de la difficulté (en terme de temps de travail et de coût) à réaliser des tests permettant d'ordonner ces marqueurs, l'ordre dans les groupes de liaison n'est pas déterminé, à quelques exceptions

près. La carte présentée est à ce jour la seule réalisée par analyse multipoints de ségrégation de marqueurs moléculaires chez *Petunia*. Les RAPD ont permis dans le cas de cette espèce de réaliser une carte génétique à un coût et dans des délais raisonnables. Cette carte sera complétée en fonction des besoins des différents programmes en cours.

Caractérisation de l'origine des fragments cartographiés

Matériel et méthodes

Le genre *Petunia* comprend des espèces à $2n = 14$ et $2n = 18$ chromosomes [19]. Nous avons choisi *P. axillaris*, *P. parodii*, *P. inflata*, *P. integrifolia* et *P. violacea* comme représentant des espèces à $2n = 14$ et *P. linearis* et *P. parviflora* comme représentant des espèces à $2n = 18$ (Tableau I). Nous avons réalisé des amplification à partir de l'ADN de ces espèces avec les mêmes amorces et dans les mêmes conditions que pour l'analyse de ségrégation.

Tableau I. Origine du matériel végétal utilisé.

Espèce	Code	2n	Couleur	Origine
<i>P. parviflora</i>		18	Pourpre	USA Collection Sink
<i>P. linearis</i>	S11	18	Rose violacé	Institute of Genetics, Amsterdam
<i>P. parodii</i>		14	Blanc	USA Collection Sink
<i>P. integrifolia</i>	S13	14	Rose violacé	Institute of Genetics, Amsterdam
<i>P. axillaris</i>	M1	14	Blanc	USA Cornell University
<i>P. inflata</i>	DII	14	Pourpre	Collection Dijon
<i>P. violacea</i>	S10	14	Pourpre	Institute of Genetics, Amsterdam
<i>P. hybrida</i>	lignées	14		
	Ta2		Pourpre	Cultivar « Velours rouge »
	Tlh1		Violet dilué	Haploïde doublé à partir de la lignée Tl67
	Sk176b		Rose pâle	Cultivar « Satin rouge »
	Pc6		Magenta	Cultivars « Salmon Gem », « Moonstone » et « Velours rouge »
	Tlv1		Violet dilué	Cultivars « Salmon Gem » et « Velours rouge »
	Tb1-3		Pourpre	Cultivar « Velours rouge »
	St40		Rose très pâle	Cultivars « Fire Chief », « Rose du ciel » et « Violet »
	St43		Rose violacé	Cultivars « Fire Chief », « Rose du ciel » et « Violet »
	Tlh7		Violet très pâle	Haploïde doublé : « Mitchell » (Michell <i>et al.</i> 1980) Rose du ciel x <i>P. axillaris</i>
	Rlkh1		Blanc	Haploïde doublé (Tlv1 x St43) x St43

L'ensemble des génotypes provient de la collection de la Station d'Amélioration des Plantes de l'INRA Dijon. Le code indiqué identifie le matériel dans cette collection. L'origine précise la collection d'origine du matériel ou dans le cas des lignées l'ascendance dont est issu le génotype.

Lorsqu'un fragment de même taille que le fragment cartographié est amplifié à partir de l'ADN d'une espèce, nous considérons que la présence de ce fragment dans *P. hybrida* témoigne d'une introgression. Afin de vérifier les homologues entre fragments amplifiés, nous réalisons des hybridations. Nous avons procédé à la récupération de 20 fragments cartographiés chez St40 (Figures 1 et 2), en utilisant la technique de *squeeze-freeze* [17] après électrophorèse. Les fragments sont marqués par *random priming* (kit Boehringer) au $\alpha^{32}\text{PdCTP}$. L'ensemble des produits d'amplification obtenus avec la même amorce que celle générant le fragment sonde est hybridé après transfert selon Southern [16] sur une membrane nylon (Biohylon + Bioprobe system). L'hybridation est réalisée à 65 °C pendant une nuit dans une solution 6X SSC ; 5 X Denhart ; 0,1 % SDS. La membrane est rincée à 65 °C, 20 mn dans une solution 2 X SSC ; 0,1 % SDS, puis 20 mn dans une solution 0,2 X SSC ; 0,1 % SDS. Différentes expositions (15 mn à 2 h), adaptées à l'intensité des signaux, ont été réalisées à - 70 °C, entre des écrans intensificateurs, sur film radiographique Blue X (Valca).

Résultats

Vingt-huit des 35 marqueurs cartographiés ont été mis en évidence dans les espèces. Nous pouvons ainsi constituer une carte synthétique de l'origine des RAPD cartographiés (Figure 2). Ceux-ci peuvent être mis en évidence dans plusieurs espèces à $2n = 14$. Nous ne mettons en évidence aucun RAPD pouvant provenir des espèces à $2n = 18$.

Discussion

La technique de récupération des fragments amplifiés utilisée ne permet pas de garantir que la sonde est constituée d'un seul type de produit d'amplification. Si 2 fragments sont confondus du fait de leur quasi-identité de taille, une incertitude intervient quant à l'interprétation du signal d'hybridation. Le fragment hybridé dans une espèce peut ne pas correspondre au fragment cartographié supposé constituer la sonde. Néanmoins, l'erreur d'interprétation porte alors sur la situation du locus ou sur l'espèce d'origine du fragment hybridé mais ne met pas en cause l'interprétation selon laquelle il y a eu introgression dans *P. hybrida*.

P. hybrida résulte de l'hybridation interspécifique. Les hypothèses quant au croisement d'origine le font dériver de *P. integrifolia* x *P. axillaris*. Nous retrouvons chez *P. hybrida* des RAPD amplifiés dans les espèces apparentées dont nous avons vérifié l'homologie. Cela témoigne du caractère stable et héritable des RAPD.

P. hybrida est une création récente (170 ans). A cette échelle de temps, il est difficile de supposer que la variabilité mise en évidence dans l'espèce puisse avoir pour origine la mutation. Le nombre important de marqueurs cartographiés (28/35) retrouvés dans les espèces apparentées permet d'établir qu'une grande part de la variabilité de *P. hybrida* provient de la variabilité existant entre les espèces ancestrales. La variabilité existant dans *P. hybrida* a donc une origine introgressive. De plus la répartition des RAPD cartographiés entre les 5 espèces à $2n = 14$ permet de supposer que la base génétique à partir de laquelle fut créée *P. hybrida* est plus large que celle généralement admise.

Carte génétique de *Petunia hybrida*, lignée St40

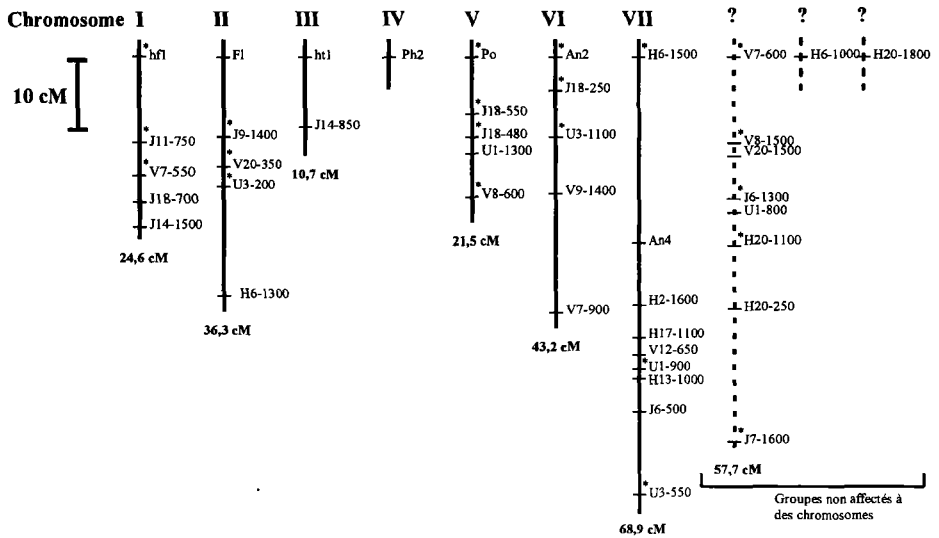


Figure 1. Les marqueurs repérés par * sont ordonnés avec un Lod score supérieur à 3,0 (logiciel Mapmaker 2.0). Les autres loci ne peuvent être ordonnés avec la même limite (Lod score < 3,0). Tous les groupes de liaisons ont été définis avec un Lod score > 3,0.

Origine des marqueurs constituant la carte de *P. hybrida* St40

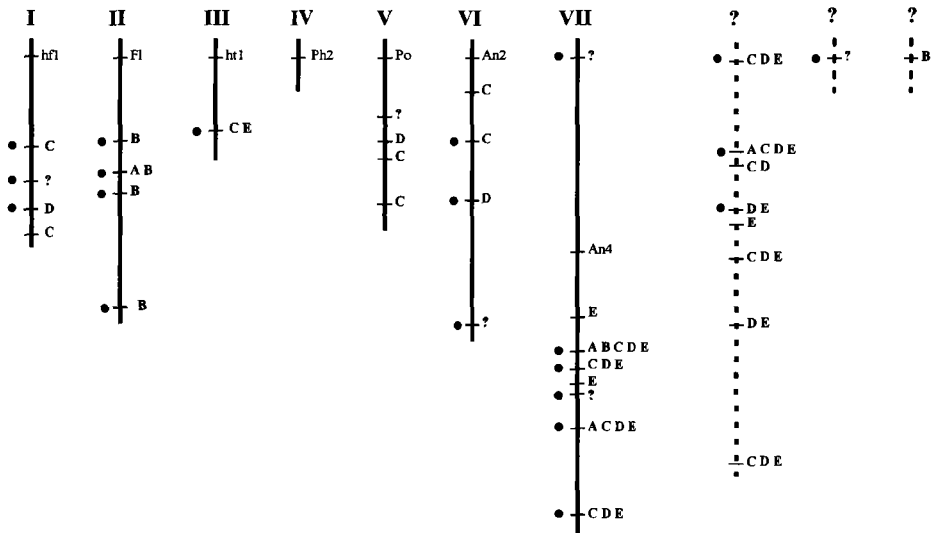


Figure 2. La présence des marqueurs repérés par un • a été vérifiée par hybridation. Un ? indique que le marqueur n'a été mis en évidence dans aucune des espèces de référence. *Petunia parodii* : A. *Petunia axillaris* : B. *Petunia integrifolia* : C. *Petunia inflata* : D. *Petunia violacea* : E.

Utilisation des RAPD pour l'analyse phénétique

Matériel et méthodes

Nous avons choisi un ensemble de 10 lignées de *P. hybrida* en cherchant à disposer d'un certain nombre de situations différentes. Les lignées choisies peuvent avoir dans leur ascendance directe une espèce ou dériver de cultivars de *P. hybrida* ou encore être dérivées de produits de croisements entre lignées (Tableau I). Parallèlement, nous utilisons l'ensemble de 7 espèces décrit précédemment. Nous réalisons des amplifications avec 17 amorces différentes (utilisées pour réaliser la carte génétique Figure 1) sur les 17 génotypes. Nous procédons après électrophorèse (dans les conditions décrites précédemment), au relevé de l'ensemble des fragments amplifiés à partir de chaque génotype. Nous obtenons une matrice nommée NGEL, dont chaque case correspond à la présence ou à l'absence d'un fragment de taille donnée, selon l'amorce utilisée et le génotype ; soit 200 fragments relevés sur 17 génotypes.

Nous avons utilisé comme sonde les 20 fragments de référence amplifiés chez St40 utilisés précédemment et les avons hybridés, dans les conditions décrites précédemment, sur le transfert de l'ensemble des produits d'amplification obtenus avec la même amorce. Nous avons relevé l'ensemble des signaux d'hybridation obtenus. Chaque case de cette matrice de résultats nommée NHYB correspond à la présence ou à l'absence d'un signal d'hybridation à une position donnée selon la sonde, l'amorce utilisée et le génotype, soit 71 signaux relevés sur 17 génotypes.

Nous avons utilisé l'indice de Jaccard [9] défini comme suit pour calculer des matrices de distances génétiques :

- soit a le nombre de fragments communs à deux individus j et k ,
- soit b le nombre de fragments présents chez j , absent chez k ,
- soit c le nombre de fragments absents chez j , présent chez k .

L'indice de similarité de Jaccard est défini comme $sJ_{jk} = \frac{a}{a+b+c}$ d'où on peut

calculer l'indice de dissemblance $dJ_{jk} = 1 - sJ_{jk}$. L'indice de dissemblance peut être considéré comme une distance variant de 0 à 1.

Nous avons utilisé la méthode d'agrégation dite *neighbor joining method*, développée par Saitou et Nei [14], pour construire des phénogrammes à partir des matrices de distances que nous avons obtenues.

Résultats

Un exemple d'amplification réalisée avec l'amorce OPV8 est présenté Figure 3. On note, selon les génotypes et la taille, la variation sous forme de présence ou absence de fragments amplifiés. L'hybridation avec le fragment OPV8-1500 permet de vérifier l'homologie avec les fragments de 1 500 pb amplifiés chez *P. parodii*, *P. integrifolia*, *P. inflata* et *P. violacea*. Un signal plus faible correspondant à un fragment de 1400 pb, est mis en évidence chez Ta2, Tlh1, Sk176b, Pc6, Tlv1, Tb1-3, St40, St43, Rlkh1. Il peut résulter soit d'une homologie partielle de la sonde avec le fragment de 1 400 pb, soit d'une contamination de la sonde par ce fragment. Le signal correspondant à un fragment de 700pb est spécifique à St43. Enfin 3 signaux correspondant à une taille de 1 000 pb sont révélés sans qu'il soit possible de repérer le fragment après coloration du gel d'électrophorèse au BET.

Nous avons procédé à des hybridations pour pouvoir vérifier les homologies de séquences et déterminer ainsi si la coïncidence de tailles des fragments est suffisante pour rendre compte des homologies. La sensibilité de détection des fragments par hybridation est 1 000 fois supérieure à celle obtenue par coloration au BET. Nous avons constaté que dans NHYB un certain nombre de fragments non visibles après coloration au BET était mis en évidence. Dans nos conditions de séparation, il est alors souvent très difficile de faire la correspondance entre les fragments révélés par hybridation et les fragments révélés après coloration au BET. Nous n'avons donc comparé les coïncidences de notation entre NHYB et NGEL que pour les tailles de fragments correspondant à celle du fragment sonde. Avec les 20 sondes employées et les résultats sur les 7 espèces et 10 lignées, on réalise une comparaison sur $17 \times 20 = 340$ points. Sur ces 340 points, 114 sont caractérisés par la présence d'un fragment. Les différences rencontrées sont de deux types, d'une part, la présence d'un fragment dans NHYB non relevé dans NGEL, d'autre part, la présence d'un fragment dans NGEL non révélé dans NHYB. En tout nous avons constaté 9 différences sur 340 points, soit un taux de 2,7 %.

Les phénogrammes obtenus d'après NGEL et NHYB en calculant les matrices de distance d'après l'indice de dissemblance de Jaccard sont présentés Figure 4. Les Figures 4A et 4B présentent les phénogrammes reliant les espèces et les lignées, obtenus en utilisant la *neighbor joining method* avec les matrices de distances de Jaccard calculées à partir de NHYB et NGEL. Dans les deux cas, l'ensemble des lignées de *P. hybrida*, à l'exception de Tlh7, est regroupé. Ce groupe se subdivise en 3 : Tlv1, Tlh1, Rlkh1, Tb1-3 ; Sk176, Pc6 ; Ta2, St40, St43. Tlh7 est rattachée à *P. axillaris*. *P. parodii* est regroupée avec *P. axillaris* dans NHYB et isolée dans NGEL. Un groupe constitué de *P. inflata*, *P. violacea* et *P. inflata* est séparé dans NHYB et dans NGEL. *P. linearis* et *P. parviflora* sont séparées mais la distance séparant ces deux espèces des autres est plus importante dans le cas de NHYB que dans le cas de NGEL.

Discussion

Les regroupements de lignées établis sur la base des matrices NGEL et NHYB sont similaires. La comparaison des regroupements avec les données concernant l'origine des lignées donne des résultats cohérents. Rlkh1 est une lignée issue d'un haploïde doublé dérivant d'un croisement (Tlv1 $\times$ St43) $\times$ St43. L'objectif était de créer une lignée portant 5 allèles de Tlv1 et deux allèles de St43, chacun des allèles étant présent à un locus porté par un chromosome différent. Le regroupement avec Tlv1 est donc logique. Dans le cas de Tlh7, cette lignée est issue de l'haplodiploïdisation d'un hybride *P. axillaris* $\times$ *P. hybrida* ; le regroupement avec *P. axillaris* peut s'expliquer de ce fait. Enfin St40 et St43 ont des origines communes dans leur ascendance et sont regroupées.

Il apparaît que l'ensemble des lignées est globalement plus proche des espèces à $2n = 14$ et à fleurs blanches (*P. parodii* et *P. axillaris*) que des espèces à fleurs colorées. Par ailleurs, l'examen des données de NGEL et de NHYB révèle qu'en moyenne, pour les RAPD dont l'origine est déterminée (soit respectivement 189 et 63), toutes les lignées étudiées possèdent environ 60 % de RAPD provenant d'au moins une espèce à fleurs blanches. *P. hybrida* provient d'un croisement interspécifique entre une espèce à fleurs blanches et une espèce à fleurs colorées. Les opérations de sélection réalisées lors des premières générations à la suite de ce croisement peuvent être à l'origine de ce rapprochement par sélection de caractères provenant de l'espèce à fleurs blanches.

Le regroupement d'espèces est en accord avec les données taxonomiques proposées

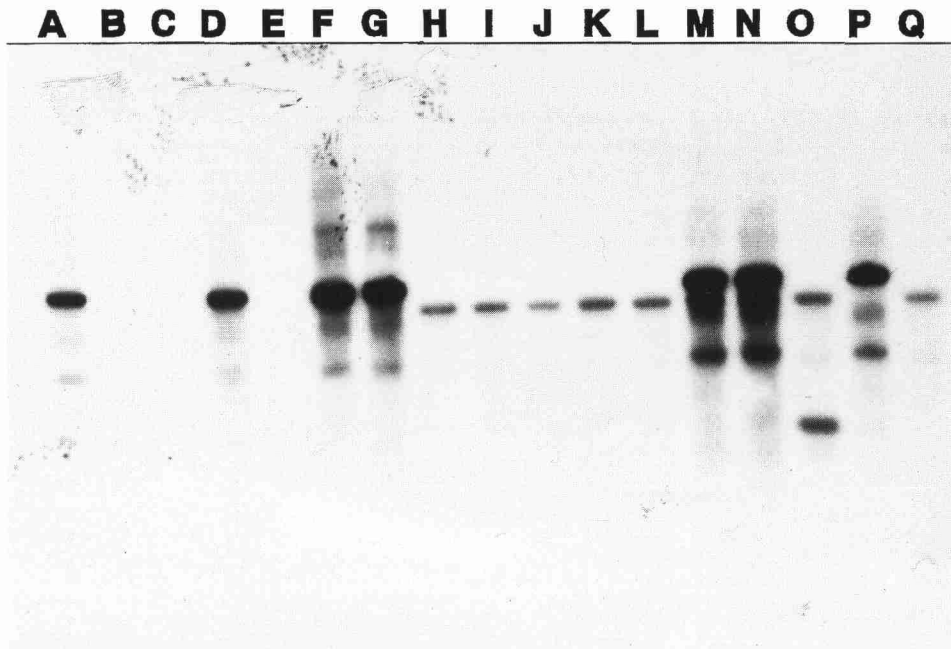


A

Séparation, après électrophorèse sur gel d'agarose à 2,2 % et coloration au BET, des produits d'amplification obtenus avec l'amorce OPV9 (30 cycles d'amplification, 92 °C 1 mn ; 38 °C 1 mn ; 74 °C 1 mn 30 s).

1Kbl : marqueur de poids moléculaire (BRL)

A : *Petunia parodi*. B : *Petunia linearis*. C : *Petunia parviflora*. D : *Petunia Integrifolia*. E : *Petunia axillaris*. F : *Petunia inflata*. G : *Petunia violacea*. H : *Petunia hybrida* Ta2. I : *Petunia hybrida* Tlh1. J : *Petunia hybrida* Sk176b. K : *Petunia hybrida* Pc6. L : *Petunia hybrida* Tlv1. M : *Petunia hybrida* Tb1-3. N : *Petunia hybrida* St40. O : *Petunia hybrida* St43. P : *Petunia hybrida* Tlh7. Q : *Petunia hybrida* Rlkh1.



B

Autoradiographie, après hybridation du transfert des produits d'amplification obtenus avec l'amorce OPV8, par un fragment amplifié chez St40 (Colonne N) marqué au $^{32}\text{PdCTP}$.

Figure 3. A. Recherche de l'origine des marqueurs. Analyse de la diversité des lignées. B. Autoradiographie après hybridation.

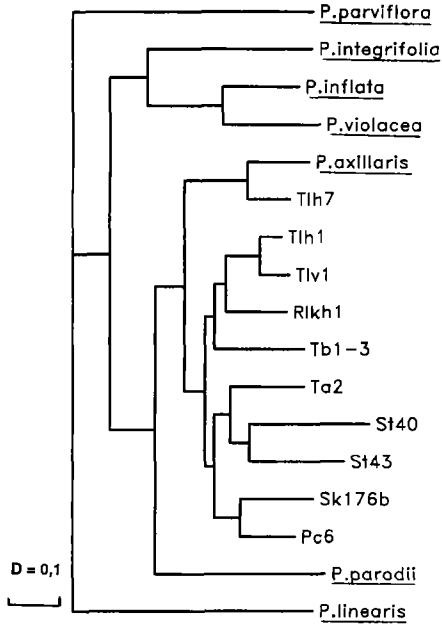


Figure 4A. Phénogramme regroupant 7 espèces du genre *Petunia* et 10 lignées de *P. hybrida* établi par la *neighbor joining method* sur la base des indices de dissemblance de Jaccard calculés à partir du relevé de 200 RAPD obtenus avec 17 amorces de 10 bases (matrice de notation NGEL).

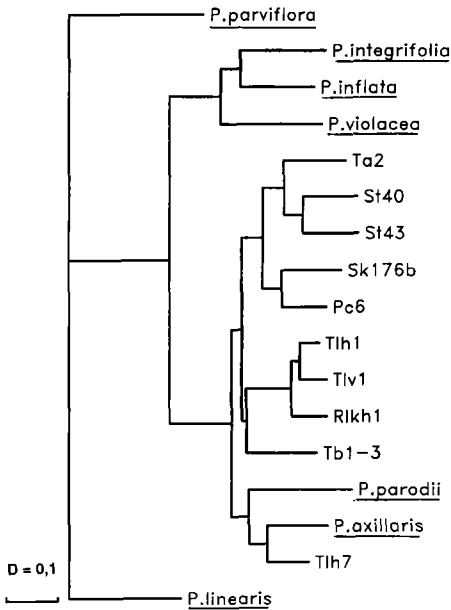


Figure 4B. Phénogramme regroupant 7 espèces du genre *Petunia* et 10 lignées de *P. hybrida* établi par la *neighbor joining method* sur la base des indices de dissemblance de Jaccard calculés à partir du relevé de 71 fragments mis en évidence après hybridation de 20 fragments de référence sur les RAPD obtenus avec 17 amorces de 10 bases (matrice de notation NHYB).

par Wijsman [21]. Les espèces à $2n = 18$ sont séparées entre elles et des autres espèces. Les espèces à $2n = 14$ à fleurs colorées sont regroupées, et séparées des espèces à fleurs blanches. Toutefois *P. violacea* est considérée par Wijsman [19] et Smith et Downs [15] comme un synonyme de *P. inflata*. La distance génétique séparant ces espèces d'après les données moléculaires ne permet pas de conclure définitivement mais va à l'encontre de l'idée d'une identité stricte. L'étude d'autres provenances serait nécessaire pour préciser l'analyse. *P. axillaris* et *P. parodii* sont séparées en accord avec les données de Wijsman [21], Cabrera [3] et Aoki et Hattori [1] qui considèrent *P. parodii* comme une sous-espèce de *P. axillaris*.

On peut noter d'après NHYB une diminution de la distance génétique séparant les espèces à fleurs colorées ainsi qu'une diminution de la distance séparant les espèces à fleurs blanches qui aboutit à regrouper *P. axillaris* et *P. parodii*. Cette diminution de distance peut provenir d'un biais engendré par le nombre réduit de signaux révélés par rapport au nombre de fragments amplifiés (71 et 200).

On constate avec la matrice NHYB un éloignement des espèces à $2n = 18$ et des espèces à $2n = 14$ par rapport aux résultats obtenus avec la matrice NGEL. Cependant dans NHYB, la distance n'est établie entre *P. parviflora* et *P. linearis* et entre ces espèces et les autres génotypes que sur la base de 5 fragments hybridés, les distances calculées ont donc peu de signification. L'exploitation des données concernant l'homologie des fragments ne peut être effectuée avec des résultats cohérents que lorsque le degré d'homologie entre les produits d'amplification de différents génotypes atteint un niveau raisonnable. Il est difficile de fixer une limite *a priori* ; celle-ci doit être établie de manière raisonnée en fonction des données disponibles concernant la proximité génétique des génotypes étudiés.

La contamination de la sonde par des produits sans rapport avec le fragment récupéré est inévitable du fait de la technique de séparation et de récupération utilisée. Elle peut conduire à la révélation de signaux correspondant à des séquences différentes de celle du fragment majoritaire. Cependant cette contamination affecte l'ensemble de l'autoradiographie. On peut considérer que les produits d'amplifications hybridés, qui sont de tailles et de séquences différentes de celle du fragment majoritaire dans la sonde, sont informatifs pour le calcul de distance, car ils dépendent eux aussi du génotype même s'ils sont sans homologie avec le fragment majoritaire. En revanche, dans le cas de signaux correspondant à des fragments non homologues mais de tailles semblables, la confusion en résultant aboutit à augmenter le nombre de similarité donc à diminuer la distance. Ce type de situation découle d'une coïncidence (présence de 2 fragments de taille semblable et de séquences différentes) qui affecte également la notation basée sur la taille. L'hybridation n'apporte alors aucun gain de précision. Par ailleurs, le taux de 2,7 % de différence constaté sur 340 points de comparaison entre les notations NHYB et NGEL apparaît faible.

Dans le cas des RAPD, une amorce peut conduire à l'amplification de séquences très différentes entre 2 espèces. Le nombre de produits d'amplification présentant des homologies diminue dans la mesure où la distance entre espèces augmente. Le nombre de points de comparaison possibles entre deux espèces devient rapidement faible ou nul. Il nous semble donc que l'emploi des RAPD doit être limité à des comparaisons entre espèces proches. Dans ces conditions, la coïncidence de taille entre 2 fragments correspond la plupart du temps à une homologie de séquence. Le surcroît de travail et de coût qu'entraîne l'hybridation systématique des fragments n'est donc pas compensé par une meilleure précision. Une notation basée sur la taille des fragments nous paraît donc suffisante pour réaliser une étude phénétique sur la base de données RAPD.

Sur le plan des résultats concernant le genre *Petunia*, nous retrouvons dans l'ensemble des lignées de *P. hybrida* Hort, considérées au début de cette expérience comme représentatives de la variabilité de cette espèce, des marqueurs provenant de chacune des espèces de *Petunia* à $2n = 14$ chromosomes. Il est donc clair que l'origine de *P. hybrida* doit être envisagée d'une manière polyphylétique. Néanmoins, l'interprétation de l'origine de *P. hybrida* comme étant le fruit d'un croisement entre *P. integrifolia* et *P. axillaris* nous paraît incomplète. L'interprétation que nous proposons est basée sur le fait que l'ensemble des espèces à $2n = 14$ est interfertile. Il est possible de regrouper ces espèces, sur la base d'arguments botaniques, en deux complexes, l'un à fleurs blanches, l'autre à fleurs colorées. Les données moléculaires que nous obtenons soutiennent ces regroupements. Les premiers hybrides ont pu être obtenus avec des individus provenant de populations sympatriques d'espèces colorées et non colorées. *P. hybrida* prendrait donc son origine dans un ou des croisements entre ces 2 complexes d'espèces. Par ailleurs, l'interfertilité entre taxa et la divergence moléculaire que nous avons révélée suggèrent que ces taxa appelés espèces naturelles à $2n = 14$ peuvent être considérés comme étant en cours de spéciation.

Références

1. Aoki C, Hattori K, (1991). Attempt to classify *Petunia* species on the basis of corolla shape. *Japan J Breed* 41 : 433-442.
2. Bernatzky R, Tanksley SD (1986). Genetics of actin-related sequences in tomato. *Theor Appl Genet* 72 : 314-321.
3. Cabrera AL (1977). Novedades en las Solanaceas de Entre Rios. *Hickenia (Bol. Darwinion)*. 1 (14) : 79-81.
4. Cornu A (1984). Genetics of *Petunia*. In : Sink KC, ed. *Monographs on theoretical and applied genetics* 9. Springer Verlag, Berlin : 34-48.
5. Cornu A, Farcy E, Maizonnier D, Haring M, Veerman W, Geratz AGM (1990). *Petunia hybrida*. Genetic maps. O'Brien SJ, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
6. Echt CS, Erdahl A, McCoy TJ (1992). Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 35 : 84-87.
7. Fries RE (1911). Die Arten der Gattung *Petunia*. *K Sven Vetenskapsakad Hand*, 46 : 1-72.
8. Hanson MR (1980). *Petunia* as a model system for molecular biologists. *Plant Mol Biol Newslett* 1 : 1-37.
9. Jaccard P (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vau Sci Nat* 44 : 223-270.
10. Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. (1987). MAPMAKER : an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 : 174-181.
11. Mitchell AZ, Hanson MR, Skvirsky RC, Ausubel FM (1980). Anther culture of *Petunia* : genotypes with high frequency of callus, root or plantlet formation. *Z Pflanzenphysiol Bd*, 100 : 131-146.
12. Reiter RS, Williams JGK, Feldmann KA, Antoni Rafalski JA (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 : 1477-1481.
13. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich EA, Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350-1354.

14. Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenic trees. *Mol Biol Evol* 4 (4) : 406-425.
15. Smith LB, Downs RJ. (1966). Part I. *Solanaceas*. Reitz PR, ed. Flora illustrada catarinense. Itajai, Santa Catarina, Brazil : 1-321.
16. Southern EM (1976). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 : 503-517
17. Tautz D, Renz M (1983). An optimized squeeze-freeze method for the recovery of DNA from agarose gels. *Anal Biochem* 132 : 14-19.
18. Vierling RA, Nguyen HT (1992). Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes. *Theor Appl Genet* 84 : 835-838.
19. Wijsman HJW (1982). On the interrelationships of certain species of *Petunia*. I. Taxonomic notes on the parental species of *Petunia hybrida*. *Acta Bot Neerl* 31 (5/6) : 477-490.
20. Wijsman HJW (1983). On the interrelationships of certain species of *Petunia*. II. Experimental data : crosses between different taxa. *Acta Bot Neerl* 32 (1/2) : 97-107.
21. Wijsman HJW, De Jong JH (1985). On the interrelationships of certain species of *Petunia*. IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. *Acta Bot Neerl* 35 (5/6) : 477-490.
22. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Antoni Rafalski J, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 (22) : 6531-6535.
23. Williams JGK, Hanafey MK, Antoni Rafalski JA, Tingey SV (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods enzymol*, 218 : 707-725. Ray Wu, ed. Academic Press inc, San Diego CA.

40

La sélection assistée par marqueurs

A. GALLAIS

*Station de Génétique Végétale, Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France.
INA-PG, 16, rue Claude-Bernard, 75242 Paris Cedex, France.*

La découverte des marqueurs moléculaires de l'ADN nucléaire ouvre une nouvelle ère pour la sélection. En rendant possible l'étiquetage de certains gènes, cela permet de rendre plus efficace la gestion et la manipulation de la variabilité génétique pour construire des génotypes ayant de plus en plus de gènes ou d'associations de gènes favorables. D'une façon large, la sélection assistée par marqueurs correspond à toute forme possible d'utilisation des marqueurs dans le processus d'amélioration. Les principales applications pour le sélectionneur sont : l'identification du matériel, la gestion des ressources génétiques, la conduite des rétrocroisements, la construction de génotypes, la prédiction de l'hétérosis, la prédiction des valeurs génotypiques et la conduite de la sélection récurrente. L'intérêt des marqueurs pour l'identification du matériel est évident. Il est aussi très clair pour la conduite des rétrocroisements : cela permet de raccourcir la durée du processus à 3 générations tout en ayant une meilleur isogénicité. Pour la prédiction de l'hétérosis et la classification en groupes d'aptitude à la combinaison, les résultats sont aussi très stimulants. L'efficacité de la construction de génotypes, c'est-à-dire du cumul progressif dans un même génotype des gènes favorables « marqués », dépend de l'importance de l'épistasie ; cela est tout à fait possible à l'intérieur d'un fond génétique donné. Au niveau de l'amélioration d'une population, les marqueurs pourront être très efficaces si le déséquilibre de liaison est important. Ils peuvent permettre l'augmentation de l'héritabilité par une meilleure séparation des effets génétiques et des effets du milieu, avec une efficacité relative d'autant plus grande que l'héritabilité sera faible. Cela renforce l'intérêt de la sélection massale, même en tenant compte du coût des analyses. Au niveau d'une sélection multicaractère, les marqueurs peuvent permettre de limiter les corrélations défavorables ; au niveau d'une

sélection multilocale, ils peuvent permettre une plus grande efficacité dans la sélection pour la stabilité des performances... Mais tous ces avantages n'existent que s'il y a une liaison assez forte entre les marqueurs et les gènes en cause.

En permettant un certain étiquetage des gènes, c'est-à-dire en rendant identifiables des gènes jusque-là non identifiables, l'accès à un grand nombre de marqueurs du génome nucléaire (du type RFLP) ouvre une ère nouvelle pour la génétique et la sélection des caractères complexes. Grâce aux marqueurs moléculaires, il devient en effet possible, d'une part, de mieux lire le génotype à travers le phénotype et, d'autre part, de contrôler les recombinaisons entre locus en cause.

La sélection assistée par marqueurs, c'est-à-dire l'utilisation des marqueurs dans le processus de sélection, peut donc concerner différents domaines :

- l'identification des génotypes pour des caractères oligogéniques (monogéniques) très influencés par le milieu ou coûteux à mesurer,
- le contrôle de la recombinaison, par l'identification, d'une part, des individus les plus complémentaires à croiser entre eux, et, d'autre part, des transgressants les plus favorables,
- la gestion de la variabilité, au niveau des ressources génétiques (par exemple, classification des populations en groupes d'aptitudes à la combinaison) ou au cours de la sélection récurrente,
- la prédiction des valeurs génotypiques pour des caractères complexes,
- la prédiction de la valeur d'un croisement à partir d'informations sur les parents.

Avec des marqueurs très liés aux locus concernés, à effets suffisamment forts et indépendants du contexte génétique, les deux premiers points sont les plus immédiats ; dans le cas où la liaison entre le marqueur et le locus n'est pas totale, ils peuvent facilement s'envisager au niveau de populations particulières où le déséquilibre de liaison n'est dû qu'au linkage (populations F2 ou dérivées, *back-cross*). Cependant, avec une liaison statistique entre les marqueurs et un caractère quantitatif – donc entre un marqueur et un ou des locus à effet quantitatif (QTL) –, tous ces points, sauf le dernier qui est relatif à la création variétale, peuvent s'envisager au niveau de n'importe quelle population en sélection récurrente, à condition qu'elle soit suffisamment en déséquilibre de liaison ; ils ne nécessitent pas la cartographie, mais, si celle-ci existe, l'utilisation des marqueurs pourra être mieux raisonnée.

Le déséquilibre de liaison dans les populations

Les populations étudiées pour la localisation des QTLs (F2, *back-cross*, lignées recombinantes) sont telles que le linkage implique le déséquilibre de liaison. Ainsi dans une F2, pour deux locus distants d'un pourcentage de recombinaison c , le déséquilibre de liaison (défini comme l'écart à l'association au hasard des locus au niveau génétique) sera $D = (1 - 2c)/4$ et il peut donc varier entre 0 et 1/4.

Dans une population résultant de l'intercroisement de deux populations complémentaires pour 2 locus indépendants (situés sur des chromosomes différents), le déséquilibre est égal au déséquilibre maximum observé en F2 (1/4). Dans une population sélectionnée, il pourra donc y avoir déséquilibre de liaison sans linkage, en plus de celui dû au linkage. Ce déséquilibre peut être dû à différents facteurs : la sélection, l'homogamie, la dérive...

La conséquence est qu'il ne sera pas possible de localiser les QTLs marqués. De plus, le déséquilibre de liaison sans linkage étant divisé par 2 à chaque multiplication en panmixie, et la fréquence des allèles marqueurs pouvant changer rapidement sous l'effet de la sélection, il faudra réestimer à chaque cycle les liaisons entre les marqueurs et les QTLs (celles qui resteront auront des chances d'être dues à des liaisons physiques). Mais, à une génération donnée, la corrélation marqueur-QTL pourra toujours être utilisée pour le choix des plantes. Le problème est de savoir si ce déséquilibre peut être important dans les populations.

Une étude sur 10 populations de maïs, avec seulement 10 marqueurs enzymatiques, semble bien montrer un déséquilibre de liaison d'une part entre marqueurs, et d'autre part entre marqueurs et QTLs de différents caractères [3].

L'effet de la présence d'épistasie

Les interactions entre QTLs pourront avoir deux types de conséquences : d'une part, elles rendront plus difficile la mise en évidence de QTLs élémentaires en atténuant voire supprimant les effets principaux de ceux-ci, et d'autre part, elles rendront leurs effets dépendant du fond génétique. Il s'agit alors de savoir si les interactions sont telles qu'elles perturbent (inversent) complètement la hiérarchie de l'effet des allèles ou si celle-ci est globalement conservée. Entre QTLs d'un croisement donné, cette hypothèse peut être plus facilement acceptable qu'entre QTLs de croisements différents. La présence d'épistasie au niveau des caractères quantitatifs a déjà été démontrée par les méthodes de la génétique quantitative [2, 13], mais est-elle importante au niveau des QTLs révélés ? Chez le maïs, le fait de trouver dans plusieurs expériences [1, 8, 10] des QTLs qui ne se retrouvent pas au niveau de la valeur propre est bien déjà une preuve de l'effet du fond génétique sur l'expression des QTLs (avec seulement additivité ou dominance, soit on retrouverait les mêmes QTLs, soit les QTLs de valeur en combinaison seraient un sous-ensemble de ceux pour la valeur propre). Si l'épistasie est importante, il faudra d'abord chercher à utiliser la variabilité due aux QTLs mis en évidence dans le fond génétique où ils ont été révélés ; pour utiliser celle due à des QTLs non homologues mis en évidence dans des fonds génétiques différents, il faudra réaliser les différentes associations possibles de QTLs et retenir celles qui seront les plus efficaces.

La construction assistée de génotypes

Le *back-cross* et la sélection généalogique assistés par les marqueurs

L'utilisation de marqueurs liés physiquement aux allèles des QTLs contrôlant la variation d'un caractère quantitatif doit permettre d'accumuler beaucoup plus rapidement dans un même génome les gènes favorables. Un exemple est donné par le *back-cross* assisté par les marqueurs. D'abord, si le gène à transférer n'est pas directement identifiable, il pourra être « marqué », ce qui permet des tests précoces et peut éviter de faire des infections artificielles pour un gène de résistance aux maladies ; de plus, cela supprime l'autofécondation nécessaire pour un gène récessif. Ensuite, dès le premier *back-*

cross, il sera possible de choisir les plantes ressemblant le plus au parent récurrent et ayant eu une recombinaison la plus proche possible du gène à transférer (à droite, puis à gauche) ; il en résultera une accélération du développement de l'isogénicité et, de plus, il sera ainsi possible de réduire très fortement la longueur du fragment chromosomique classiquement transmise avec le gène à transférer. Ce segment peut en effet représenter jusqu'à 20 % du chromosome donneur ; Stam et Zeven [9], Young et Tanksley [12] avec le transfert de la résistance au TMV chez la tomate ont montré qu'avec trois *back-cross* assistés il est possible de faire mieux qu'avec 7 non assistés (en fait il aurait fallu plus de 100 *back-cross* pour obtenir le même résultat).

D'une façon plus générale, en l'absence d'épistasie, il sera possible, par les marqueurs, d'accumuler dans un même génotype le maximum de QTLs favorables, soit par *back-cross* assisté avec un génotype donneur et un génotype receveur (on peut envisager de transférer plusieurs QTLs, 2 ou 3, non liés à la fois), soit par sélection généalogique assistée dans le cas où l'on ne cherche pas l'isogénicité mais simplement à isoler les transgressants les plus favorables possibles. Dans ce cas, parmi les lignées dérivant d'un croisement (par HD ou SSD), il sera possible de retenir celles ayant accumulé le maximum de gènes marqués favorables et de continuer en recroisant entre elles les lignées transgressantes complémentaires.

Les premiers résultats expérimentaux de Stuber et Sisco [10] chez le maïs montrent bien l'intérêt de l'utilisation des marqueurs liés à des QTLs pour la construction de lignées hybrides très performantes en combinaisons hybrides.

La construction de génotypes stables

Dans une expérience de recherche de QTLs au niveau de croisements interspécifiques chez la tomate et dans 3 milieux différents, Paterson *et al.* [7], sur 29 QTLs détectés, en ont trouvé 4 communs aux 3 lieux, 10 communs à 2 lieux et 15 spécifiques à un lieu. Ainsi, dans la mesure où il semble exister des QTLs spécifiques d'adaptation à certains milieux (ce qui était prévisible), pour construire la variété la plus stable possible, il faudra accumuler dans un même génotype le maximum de QTLs d'adaptation. Les marqueurs devraient permettre de construire, plus rapidement et avec plus de sécurité, de tels génotypes.

A l'intérieur d'une F₂, cette construction pourra se faire, comme précédemment, par la sélection généalogique assistée, avec identification des lignées les plus transgressantes et croisement des lignées les plus complémentaires pour initier un nouveau cycle de sélection généalogique assistée. Dans une population où l'on trouvera des associations marqueurs-caractère quantitatif spécifiques à certains milieux, on pourra aussi supposer que les QTLs marqués seront différents ; la recombinaison de plantes complémentaires devrait donc permettre d'augmenter la fréquence des associations de gènes favorables et ainsi d'augmenter la chance de créer une variété de comportement plus stable.

La rupture de corrélations défavorables entre caractères

L'analyse par les marqueurs permet de séparer dans une corrélation génétique ce qui peut être dû à la pléiotropie (QTLs communs) et ce qui peut être dû au déséquilibre de liaison (QTLs spécifiques à chaque caractère). S'il existe des QTLs spécifiques à chacun des caractères (liés négativement), alors, par sélection assistée, il sera possible d'amener ces QTLs dans un même génotype, et donc l'intensité de la corrélation défavorable sera diminuée, voire annulée, s'il n'y a pas de pléiotropie.

Dans ces deux exemples, l'avantage des marqueurs sera de diriger vraiment les

recombinaisons, supprimant ainsi une grande part de hasard : il en résultera sans doute un gain de temps et une meilleure utilisation de la variabilité. Mais, comme pour la sélection généalogique assistée, le succès de la construction dépend toutefois de l'importance de l'épistasie.

La construction récurrente de génotypes et la gestion de la variabilité en sélection récurrente

Pour un caractère complexe, l'accumulation des gènes ou combinaisons de gènes (QTLs marqués) favorables demandera sans doute plusieurs cycles d'extraction de lignées suivie de l'identification de celles qui ont les meilleurs QTLs et de l'intercroisement des plus complémentaires ; on passe ainsi à la construction récurrente de génotypes.

Dans ce processus, le marquage direct des QTLs sera le plus efficace. Mais il est aussi possible d'utiliser les marqueurs en sélection récurrente de façon plus statistique pour gérer la variabilité globalement, éviter de retenir des plantes à intercroiser qui sont trop proches, croiser là aussi les plantes ou les lignées les plus complémentaires, mais seulement pour les marqueurs, sans identifier les QTLs. En sélection récurrente réciproque, les marqueurs peuvent aussi être très efficaces pour aider à accélérer le développement de la complémentarité des populations.

La classification en groupes d'aptitudes à la combinaison et la prédiction de l'hétérosis

Classification en groupes d'aptitude à la combinaison

Chez le maïs, les résultats expérimentaux [14, 15] montrent qu'un marquage assez dense du génome peut être très efficace pour classer des lignées en groupes d'origine. Il permet de très bien retrouver les lignées apparentées et d'identifier celles ayant une origine mixte. C'est donc un outil très puissant pour gérer un ensemble de lignées. Peut-il être utilisé au niveau de populations ? Les résultats sur lignées permettent de le penser, mais il faudra pour cela mettre au point des techniques de marquage applicables à des mélanges d'individus afin de diminuer le nombre d'analyses à faire, ou alors il faudrait une forte diminution des coûts des analyses (avec 1 000 populations, 100 individus par population et 60 marqueurs par individu, cela ferait 6 millions d'analyses!...)

Prédiction de l'hétérosis

Dans une grande gamme de variation des distances RFLP entre lignées, il apparaît une très bonne corrélation entre hétérosis (ou la valeur F1) et la distance entre lignées [16]. Cela ne fait que traduire la relation bien connue entre vigueur et niveau de consanguinité. En effet, les lignées les plus proches sont les plus apparentées et donnent donc les croisements les plus consanguins. La relation est beaucoup plus floue dans l'intervalle de variation qui intéresse la sélectionneur. Ainsi les travaux de Charcosset [14] et de Melchinger [15] chez le maïs précoce montrent bien, sur un ensemble de croisements corné x corné, denté x denté et corné x denté, une relation entre l'ASC (hétérosis spécifique) et la distance spécifique ; mais à l'intérieur des croisements corné x denté, la variation de distance étant relativement réduite, la relation entre hétérosis et distance tend à disparaître. Sur le haricot, Nienhuis [17], a obtenu des résultats très similaires.

Les travaux de Charcosset [16] montrent de plus que les marqueurs peuvent être

très efficaces pour réduire les effets d'ASC dus essentiellement à des croisements entre lignées plus proches. La prise en considération des AGC et des distances RFLP devrait donc permettre d'améliorer l'efficacité de la prédiction de la valeur des croisements. Cependant, il faudrait ne retenir que les marqueurs liés à des QTLs impliqués dans l'hétérosis ; la présence de marqueurs non liés à de tels QTLs risque de brouiller la prédiction. Lorsque les groupes d'aptitudes à la combinaison des lignées ne sont pas connus, l'intérêt des marqueurs pour la prédiction de la valeur F1 apparaît indiscutable.

La prédiction des valeurs génotypiques

L'intérêt attendu du marquage

Si un marqueur est lié par déséquilibre de liaison, quelle qu'en soit l'origine, à un locus affectant un caractère quantitatif (QTL), alors connaissant le génotype marqueur, il devient possible d'estimer avec beaucoup de précision la part de la variabilité génétique du caractère quantitatif due au QTL marqué à la génération considérée. En effet, dans un milieu donné, la part des variations aléatoires dues au micro-milieu sera très fortement réduite par le fait que la valeur d'un génotype marqueur sera calculée sur la moyenne d'un assez grand nombre d'individus (les individus d'un même génotype marqueur sont en fait des « répétitions » du QTL).

Avec plusieurs marqueurs, le sélectionneur peut donc disposer d'une information très riche qui s'ajoutera à la mesure directe du caractère quantitatif. Les marqueurs sont en fait à considérer comme des caractères associés au caractère principal à sélectionner. La sélection assistée par marqueurs (SAM) consiste à utiliser ces deux sources d'informations. A l'extrême, avec une liaison stricte entre les marqueurs et les QTLs et un fort pourcentage de variance expliqué par les marqueurs, il serait possible de n'utiliser que l'information marqueur (cas de sélection indirecte). Dans la situation la plus courante, liaison non stricte et pourcentage de variance expliquée, sans doute inférieur à 50 %, il faudra considérer les deux sources de variation, celle due aux QTLs marqués et celle due aux QTLs non marqués, et probablement réestimer à chaque génération les liaisons entre les marqueurs et les QTLs. Dans ce cas, la liaison physique (linkage) n'est pas nécessaire, seul le déséquilibre de liaison (corrélation entre le marqueur et le QTL) compte.

L'importance de la variation due aux QTLs non marqués sera variable selon les caractères, mais pour un caractère complexe comme le rendement, elle sera sans doute toujours non négligeable. En effet, même avec un marquage dense, la distribution en L des effets des QTLs (peu de QTLs à forts effets et probablement nombreux QTLs à faibles effets) fait que pour des caractères complexes, de nombreux QTLs à faibles effets ne pourront pas être mis en évidence par suite de limites dans la précision expérimentale. L'existence de tels QTLs à côté des QTLs marqués justifie aussi une sélection combinant l'information marqueurs et les mesures phénotypiques des caractères sélectionnés.

L'analyse des effets associés aux marqueurs

L'étude de la liaison entre les marqueurs et les caractères quantitatifs peut s'envisager pour tous les types de test, par exemple :

- valeur propre,
- valeur en S1 (autofécondation),
- valeur en combinaison,
- valeur en lignées.

Elle peut aussi s'envisager au niveau individuel ou familial.

Pour un caractère quantitatif donné, la valeur prédite par les marqueurs peut s'obtenir par régression de la valeur phénotypique sur des variables codées décrivant les génotypes marqueurs. Cela revient en fait à calculer la moyenne de chaque génotype marqueur. De là il est possible de déduire la variance génétique expliquée par le marqueur (par analyse de variance ou modèle à effets aléatoires).

A partir des valeurs génotypiques associées aux génotypes marqueurs, il est possible de calculer des effets génétiques comme pour n'importe quel caractère quantitatif : additivité, dominance, épistasie... Ce qui est nouveau ici, c'est que les génotypes sont identifiés et donc il est possible de calculer les effets additifs associés aux allèles marqueurs ainsi que les effets de dominance, s'ils existent (cas de valeur propre et de valeur en S1). Les effets additifs se calculent par régression de la valeur phénotypique sur « la dose » de chaque allèle marqueur. A partir de ces effets additifs, la variance d'additivité expliquée par le marqueur peut être calculée directement.

Ainsi, par simple étude de la population par les marqueurs et les caractères quantitatifs, il est possible d'avoir accès aux variances génotypique et additive expliquées par les marqueurs, alors qu'avec des gènes non marqués il faudrait avoir recours à des dispositifs et plans de croisement plus ou moins complexes selon le système de test.

Une hérabilité peut aussi être définie pour le locus marqueur, par le rapport de la variance génotypique du locus marqueur à sa variance phénotypique. Cette hérabilité sera proche de 1 pour des effectifs assez élevés dans chaque classe, car dans ce cas la moyenne phénotypique d'une classe correspondra à la valeur génotypique. Enfin, le carré de la corrélation (r^2) entre le locus marqueur et le caractère quantitatif est directement la proportion de variance phénotypique expliquée par le marqueur. Elle est donc égale au produit de la proportion de variance génétique (m^2) expliquée par le marqueur par l'hérabilité (h^2) du caractère quantitatif ($r^2 = m^2 h^2$).

Un locus marqueur a donc tous les attributs d'un caractère quantitatif : valeurs génotypiques, effets génétiques, hérabilité et corrélation génétique avec le caractère considéré. Le sélectionneur peut donc utiliser les marqueurs comme des caractères associés aux caractères sélectionnés (et avec les mêmes logiciels).

La formulation générale du problème

Le problème est de prévoir la valeur (G) des enfants connaissant le phénotype (P) des unités (individus ou familles) candidates à la sélection et leur génotype marqueur. La meilleure prédiction est la régression multiple suivante :

$$G_{P,M} = \beta_0 P + \sum \beta_i a_i$$

a_i étant la valeur additive associée aux marqueurs du QTL i .

Avec des QTLs indépendants, et avec une sélection directe, il suffit de faire la régression sur P et $A^* = \sum a_i$ (valeur additive totale due aux marqueurs). A partir de

valeurs génétiques prévues, il est possible de calculer le progrès génétique [5]. Il apparaît que le gain attendu en efficacité relative (par rapport à la sélection sans marqueurs) est d'autant plus grand que l'héritabilité est faible et que la proportion de variance expliquée est forte. En fait, l'intérêt de la SAM chute très vite dès que l'héritabilité augmente. Elle n'est attendue intéressante que pour les situations à faible héritabilité ($h^2 < 0,30$), et plus particulièrement pour la sélection massale.

Quelques résultats expérimentaux

Les résultats de Paterson *et al.* [7] sur tomate et de Stuber *et al.* [10] sur maïs, qui correspondent en fait à des expériences de sélection indirecte avec marqueurs, tendent bien à confirmer ce qui est attendu sur la base de la théorie. Paterson *et al.* [7] sur une F2 d'un croisement *Lycopersicum esculentum* $\times$ *L. chesmanii* montrent que la sélection pour les seuls marqueurs est d'autant plus efficace (par rapport à la sélection phénotypique) que l'héritabilité est faible ; à forte héritabilité, elle est même inférieure à la sélection directe, ce qui tend à prouver qu'il y a une contribution importante de gènes non marqués. Stuber *et al.* [11] montrent sur une F2 de maïs que la sélection indirecte avec marqueurs peut être aussi efficace, voire plus efficace, qu'une sélection directe. Cependant, en un cycle de sélection, l'étude de la variation de fréquence des marqueurs montre une variation bien plus rapide en sélection directe (phénotypique), pour un même progrès. Cela prouve le rôle des gènes non marqués ; la combinaison des deux types de sélection aurait donc sans doute été la méthode la plus efficace.

Comparaison avec d'autres méthodes

L'utilisation des marqueurs peut être considérée comme un moyen pour augmenter l'héritabilité du ou des caractères sélectionnés. Son efficacité doit donc être comparée à celle d'autres moyens d'augmentation de l'héritabilité, à la disposition du sélectionneur : augmentation du nombre de répétitions, utilisation des corrélations entre caractères secondaires et caractères primaires, prise en considération des relations entre apparentés. Tous sont d'autant plus efficaces que l'héritabilité est faible.

La démarche de la SAM est la même qu'avec des caractères secondaires. Si l'on trouve un caractère secondaire très lié (génétiquement) au caractère principal et plus héritable que ce dernier (et si possible une corrélation génétique opposée à la corrélation environnementale), alors la prise en compte de l'information apportée par le caractère secondaire, en plus de la mesure du caractère primaire, peut rendre cette méthode très compétitive par rapport à la SAM. Le problème est qu'il peut être difficile de trouver le ou les caractères secondaires (car il est possible de travailler sur une combinaison linéaire de tels caractères) ayant toutes les qualités voulues, alors qu'avec un marquage assez dense du génome, il ne doit pas y avoir de problème pour trouver des marqueurs efficaces. En retour, il est d'ailleurs possible que ceux-ci fassent découvrir les caractères secondaires qu'il faudrait mesurer. Il y aurait alors le choix entre utiliser les marqueurs ou mesurer les caractères secondaires les plus significatifs.

L'utilisation des relations entre apparentés, illustrée dans le cas d'additivité stricte avec sélection individuelle (cas de sélection sur un index valeur familiale, valeur individuelle), est évidemment d'autant plus efficace que l'apparentement est fort ; l'apparentement revient d'ailleurs à prendre en considération la répétition de l'information génétique présente dans des individus apparentés. De ce point de vue, le clonage des individus sera le plus efficace (ce n'est plus nécessairement vrai lorsqu'il y a de la dominance). L'aug-

mentation du nombre de répétitions est sans doute le moyen le plus direct à la disposition du sélectionneur. Des gains d'efficacité tout à fait comparables à ceux de la SAM peuvent être atteints. Il est d'ailleurs possible de chiffrer en équivalent répétitions, le gain d'information de la SAM. Avec $h^2 = 0,10$, 10 répétitions conduisent à une héritabilité de 0,50 ; pour avoir cette même efficacité avec les marqueurs, il faudrait que le pourcentage de variance expliquée par les marqueurs soit d'au moins 50 %.

Les différents moyens d'augmentation de l'héritabilité, y compris les marqueurs, ne présentent d'ailleurs guère d'intérêt dès que l'héritabilité est supérieure à 0,40 - 0,50. En particulier, la combinaison des marqueurs et de toute autre méthode d'augmentation de l'héritabilité ne présente que peu d'intérêt si cette méthode permet d'atteindre une héritabilité supérieure à 0,40 - 0,50.

Comparaison de différentes méthodes de sélection assistée par marqueurs

• Intérêt de la sélection massale et de la sélection familiale pleins-frères

En sélection non assistée, la sélection massale n'est reconnue efficace que pour des héritabilités assez fortes. Cela est vrai si l'on fait abstraction du fait qu'elle permet des intensités de sélection beaucoup plus fortes que les autres méthodes et que la durée de son cycle est très courte (un an pour une plante annuelle). Sur la base du progrès génétique par unité de temps, sans générations dérobées, il faut en fait atteindre de très faibles héritabilités pour qu'elle ne soit pas la plus efficace. Pour une héritabilité au sens large faible ($< 0,10$), la sélection familiale pleins-frères sera la plus efficace, sauf si la proportion de variance additive est faible (en ce cas, la sélection sur descendances demi-frères peut être la plus efficace). Avec l'utilisation de marqueurs, la sélection individuelle phénotypique est pratiquement toujours la plus efficace. Par rapport aux autres méthodes, la prise en considération de l'effet de la sélection phénotypique des parents ne change rien à ce résultat.

L'utilisation de générations dérobées rend plus compétitive la sélection familiale pleins-frères. Sans marqueurs la sélection familiale pleins-frères a un très grand domaine d'efficacité. L'utilisation de marqueurs réduit ce domaine dans une proportion dépendant du degré d'explication de la variance par les marqueurs (m^2) et du pourcentage de variance additive (a^2). Si a est faible dès que m^2 est supérieure à 10 %, la sélection massale est la plus efficace, même avec un h très faible (0,05). Dans le cas d'additivité stricte ($a^2 = 1$), il faut que m^2 soit supérieur à 25 % pour qu'avec une h^2 de 0,05 la sélection massale soit la plus efficace. Ce relativement grand domaine d'efficacité de la sélection massale est dû à l'augmentation d'efficacité bien plus rapide pour cette méthode que pour les autres méthodes lorsque le pourcentage de variance expliqué par les marqueurs augmente.

La sélection assistée par marqueurs réhabilite donc la sélection massale pour tous les cas où la notion d'individu a un sens (cas de culture en plantes semi-isolées, facilement identifiables, sans de trop forts effets de compétition). En présence d'interaction génotype $\times$ milieu, il faudra faire appel à la sélection convergente divergente proposée et appliquée par Lonnquist *et al.* [6]. Dans ce schéma, la population de sélection est répartie dans les différents lieux de sélection ; une sélection indépendante est réalisée dans chaque lieu et les unités sélectionnées sont mélangées pour constituer la génération suivante qui est à nouveau répartie dans tous les lieux. Avec les marqueurs, cette méthode permettra de repérer les QTLs d'adaptation à des milieux particuliers et il sera donc possible de diriger les recombinaisons et d'être plus rapidement efficace dans la sélection pour la stabilité.

• *Sélection assistée par marqueurs et optimisation des moyens*

La sélection assistée par marqueurs doit conduire à repenser toute l'optimisation des moyens pour les caractères à faible héritabilité. Deux exemples seront donnés : la sélection sur descendances (ou familiale) et la sélection multilocale.

Dans toute sélection faisant appel au test de familles, pour des caractères à faible héritabilité, il faut en général des effectifs assez élevés par famille. Pour un nombre donné de plantes étudiables, le nombre de familles étudiées sera donc relativement faible et l'intensité de sélection ne pourra pas être trop forte (pour un nombre donné d'unités sélectionnées). Pour augmenter l'intensité de sélection, il faudrait augmenter le nombre de familles étudiées et donc diminuer le nombre de plantes par famille ; cela se traduira alors par une diminution de l'héritabilité au niveau des moyennes de famille, ce qui diminuera le progrès génétique si l'effectif précédent correspondait à l'optimum. Pour de faibles effectifs par famille, l'utilisation des marqueurs, en augmentant l'héritabilité, permettra d'être plus efficace que la sélection classique, même à son optimum [4].

Dans la sélection multilocale, en présence d'interaction génotype $\times$ milieu, la meilleure stratégie est d'étudier le matériel (familles, descendances) dans le plus grand nombre de milieux, avec une seule répétition par milieu. Cela conduit donc à une héritabilité faible pour un milieu donné mais à une plus grande précision sur la valeur génotypique du matériel. L'introduction des marqueurs va permettre d'augmenter l'héritabilité dans chaque milieu de test et ainsi il sera possible de voir les adaptations particulières et de repérer les QTLs d'adaptation : il devient possible de sélectionner simultanément et efficacement sur la performance moyenne et sur la stabilité des performances.

Conclusion

Il est des domaines où l'intérêt des marqueurs pour la sélection ne fait aucun doute, c'est le cas :

- du marquage direct de gènes dont l'effet est difficile ou coûteux à apprécier,
- des *back-cross*,
- de la classification en groupes d'aptitude à la combinaison,
- de la gestion de la variabilité en sélection récurrente.

Pour une plus large utilisation des marqueurs dans la construction de génotypes par sélection généalogique ou par sélection récurrente, il faudrait avoir plus d'idées sur l'importance de l'épistasie (même si on peut prédire qu'elle existe, le problème est de savoir si elle peut remettre en cause certains effets des QTLs). Par le contrôle des recombinaisons au niveau de l'intercroisement, la sélection récurrente assistée ressemble d'ailleurs beaucoup à la sélection généalogique avec plusieurs cycles. Les deux stratégies se fondent dans la construction récurrente de génotypes. L'essentiel est de limiter la longueur des cycles, d'où l'intérêt de l'haplodiploïdisation et des générations dérobées.

L'utilisation des marqueurs pour augmenter la précision dans l'évaluation de valeurs génotypiques se pose plus en termes de coût par rapport à d'autres méthodes qui peuvent permettre aussi d'augmenter cette précision. Si une technique comme les RFLP ou les RAPD se banalise, alors leur utilisation redonnerait beaucoup plus d'importance à la sélection individuelle sur le phénotype (si la valeur individuelle a un

sens). Mais après chaque sélection, il faudra réévaluer les liaisons entre marqueurs et QTLs.

Dans tous les cas, des marqueurs liés de façon absolue aux gènes seront d'un intérêt bien plus grand que ceux liés de façon statistique. Les progrès dans les connaissances permettent d'espérer ce type de marqueurs (c'est ce qui est recherché à partir des gènes « candidats » – pour des QTLs – ou des sondes cDNA). Cela donnera encore plus de puissance au généticien et au sélectionneur pour l'analyse, la gestion et l'utilisation de la variabilité génétique. C'est vraiment une ère nouvelle qui s'ouvre pour la génétique des caractères complexes et donc pour le sélectionneur. Les marqueurs vont conduire aux gènes, les gènes aux caractères élémentaires... C'est toute l'organisation de l'expression de la variabilité génétique qui pourra être décortiquée. Ainsi la génétique quantitative deviendra de moins en moins aveugle... et la sélection ressemblera de plus en plus à la construction dirigée de génotypes...

Références

1. Baud S (1992). Recherche de corrélations entre marqueurs moléculaires de type RFLP et caractères agronomiques chez *Zea mays*. Thèse Fac. Sc. Lyon 1.
2. Bauman LF (1959). Evidence of non allelic gene interaction in determining yield, ear height and kernel row number in corn. *Agr J* 51 : 551-534.
3. Garnier P (1992). Contribution à l'étude de la variabilité génétique intra et interpopulation chez le maïs. Valorisation d'informations agromorphologiques et enzymatiques. Thèse INA P-G.
4. Lande R (1991). Marker assisted selection in relation to traditional methods of plant breeding. In : Stalker HT, Murphy JP, eds. Plant breeding in the 1990s. CAB Inter. 437-451.
5. Lande R, Thompson R, 1990. Efficiency of marker assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124 : 743-756.
6. Lonnquist JH *et al.* (1979). Convergent, divergent selection for area improvement in Maize. *Crop Sci* 19 : 602-604.
7. Paterson AH *et al.* (1991). Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato : comparison across species, generations and environment. *Genetics* 127 : 181-197.
8. Pioneer H. Biol. Int. (1989). Identification and genetic localisation of loci affecting yield and other agronomic traits in Maize. Poster XII Eucarpia Congress. Göttingen (RFA).
9. Stam P, Zeven C (1981). The theoretical properties of the donor genome in mean isogenic lines of self-fertilizers bred by back-crossing. *Euphytica* 30 : 227-238.
10. Stuber CW (1989). Marker based selection for quantitative traits. In : Robbelen G, ed. *Science for Plant Breeding*. Proc. of the XII Eucarpia Congress. Paul Paray Pub. Berlin : 31-49.
11. Stuber CW, Sisco PL (1993). Marker facilitated transfer of QTL alleles between elite inbred lines and response in hybrids. 46th Annual Corn and Sorghum Res Conf : 104-112.
12. Young ND, Tanksley SD (1989). RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the TM-2 locus of tomato during back-cross breeding. *Theor Appl Genet* 77 : 353-359.
13. Mather K, Jinks JL (1971). *Biometrical genetics*. Chapman and Hall. 2nd ed.
14. Charcosset A *et al.* (1992). Utilisation des techniques de marquage génétique pour l'analyse de la variabilité génétique et la prédiction du phénomène d'hétérosis. *Sel Fr* 44.
15. Melchinger AI *et al.* (1992). Genetic diversity for RFLPs in european maize inbreds. II. Relation to performance of hybrids within versus between heterotic groups for forage traits. *Theo Applied Genet* 84 : 672-681.
16. Charcosset (1992). Prediction of heterosis. In : Dattée Y, Dumas C, Gallais A, eds. *Reproductive biology and plant breeding* : 355-366.
17. Nienhuis J, Gavin S (1992). The potential of hybrid varieties in self-pollinating vegetables. In : Dattée Y, Dumas C, Gallais A, eds. *Reproductive biology and plant breeding* : 387-396.

41

Identification variétale et ressources génétiques chez le figuier (*Ficus carica* L.) : utilisation des marqueurs RAPD

BOUCHAIB KHADARI¹, PHILIPPE LASHERMES², FINN KJELLBERG¹

1. CEFÉ-CNRS, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex, France.

2. ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex, France.

Résumé

*L'identification de 21 échantillons de figuier (*Ficus carica* L.) représentant différentes variétés cultivées a été réalisée par la technique RAPD (random amplified polymorphism DNA). Des amorces donnant des résultats reproductibles et révélant du polymorphisme au sein d'un sous-ensemble de quatre génotypes ont été préalablement sélectionnées. 19 marqueurs sont obtenus par l'utilisation de 12 amorces et ont permis de caractériser 17 génotypes. L'analyse a mis en évidence une erreur d'étiquetage pour un échantillon et une synonymie pour deux autres. La reproductibilité des résultats, la stabilité au sein d'un clone et le polymorphisme suffisamment élevé font de ces marqueurs un outil efficace pour l'identification variétale chez le figuier. Les génotypes étudiés ont une base génétique relativement large sans différenciation en sous-groupes distincts, probablement sous l'effet d'un brassage de gènes important en populations naturelles. Les marqueurs identifiés dans cette étude pourraient servir pour l'analyse de la diversité génétique d'un plus grand nombre de variétés cultivées et des populations naturelles de *Ficus carica*.*

Ficus carica L. est une espèce gynodioïque qui se reproduit spontanément dans la région circum-méditerranéenne. Il existe deux formes sexuelles : 1) le figuier domestique ne produit que des graines, ses fleurs mâles sont stériles ; 2) le caprifiguiier abrite l'insecte-pollinisateur, *Blastophaga psenes*, sous forme de larve dans les ovaires des fleurs femelles et produit du pollen [20]. Cette espèce est abondamment cultivée sur le pourtour méditerranéen car elle produit des figues qui sont, pour la plupart, comestibles. La production est commercialisée sous forme de figues fraîches ou séchées. Les figues, pour être séchées, nécessitent une teneur en sucre élevée qui ne peut être obtenue que par pollinisation, alors que les figues fraîches sont produites, en majeure partie, par des variétés parthénocarpiques ne nécessitant pas de pollinisation. La culture du figuier s'est toujours accompagnée d'une connaissance plus ou moins précise de variétés de cette espèce. Une variété de figuier regroupe tous les individus qui sont issus d'un même génotype par multiplication végétative. Ce génotype, généralement prélevé directement dans la nature, est choisi pour ses caractères agronomiques (grosses figues charnues s'il s'agit de figues fraîches ou bien sucrées dans le cas de figues séchées, production importante de figues,...). Beaucoup de collections de variétés de figuier sont maintenues par des pépiniéristes qui sont confrontés à des erreurs d'identification et à des synonymies. Il est donc nécessaire de disposer de moyens permettant l'identification des variétés qui sont rassemblées au sein d'une collection.

Le moyen classique d'identification des génotypes est basé sur les caractères morphologiques. Utilisant des critères comme la taille et la forme du fruit et de la feuille, la couleur de l'épiderme, etc., Condit [10] a pu classer un peu plus de 600 variétés de figuiers. Néanmoins, ces caractères sont le plus souvent sous l'influence des conditions du milieu [9] et, en général, ne correspondent pas à des critères alternatifs qui permettent de séparer les phénotypes en groupes distincts bien définis [32]. Plusieurs travaux ont utilisé le polymorphisme protéique comme moyen d'identification des variétés [3, 2, 35]. L'étude de 61 variétés de figuiers à l'aide de 4 loci polymorphes a permis de distinguer 41 spectres alloenzymatiques différents dont certains sont communs à 2 variétés ou plus [33]. Le succès de l'identification des génotypes par les marqueurs enzymatiques est conditionné par le nombre de systèmes enzymatiques et d'allèles étudiés. Ce nombre étant souvent limité, il ne permet pas d'avoir un polymorphisme suffisamment important pour caractériser l'ensemble des variétés [2, 30, 33 35]. De plus, comme les protéines sont des produits d'expression des gènes, elles peuvent varier selon l'organe, le tissu, le stade de développement ou même selon les conditions du milieu [4]. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction obtenu par l'utilisation de sondes minisatellites [11, 29] ou de sondes microsatellites [36] permet d'identifier avec succès les génotypes, même dans le cas d'une base génétique étroite. Cependant, cette technique reste très laborieuse à mettre en œuvre et nécessite souvent l'emploi de la radioactivité.

Récemment, une technique basée sur l'amplification en chaîne par polymérisation ou PCR (*polymerase chain reaction*) nommée *random amplified polymorphism DNA* (RAPD) a été développée par Williams *et al* [41] et par Welsh and McClelland [37]. Les amorces utilisées sont des séquences arbitraires et peuvent s'hybrider à de l'ADN répété, comme à des séquences de faible nombre de copies [39, 41]. Les marqueurs obtenus par cette technique ont généralement une transmission mendélienne [7, 18]. Ils peuvent être utilisés comme marqueurs d'introgession [1] ou dans certains cas pour déterminer la paternité et les relations de parenté entre individus [15, 38]. Par ailleurs, ils sont utilisés dans la construction des cartes de liaison génétique [21, 31]. Cette technique n'est pas limitée par le nombre d'amorces et permet d'identifier fréquemment le

polymorphisme qui existe entre individus étudiés. Elle offre le moyen d'étudier la variabilité génétique au sein d'un complexe d'espèces [24, 40], dans les populations naturelles d'une même espèce [8, 17, 26, 34] ou pour caractériser les différents génotypes [16, 22, 39, 44].

Le nombre croissant des travaux réalisés à l'aide des marqueurs RAPD laisse à penser qu'ils seraient un moyen adapté à l'étude de la variabilité génétique de *Ficus carica*. Ce travail consiste à rechercher et à caractériser des marqueurs RAPD en vue d'identifier les différents génotypes qui sont présents au sein d'un ensemble d'échantillons de figuiers. Notre objectif est de montrer que l'application de la technique RAPD à l'identification des variétés de figuiers est possible, et de disposer d'un ensemble de marqueurs pour étudier, par la suite, la variabilité génétique des populations naturelles de cette espèce.

Matériel et méthode

Matériel végétal

L'étude est réalisée sur 21 échantillons de figuiers représentant 19 dénominations distinctes. Il s'agit d'un sous-ensemble représentatif des collections qui sont maintenues par les pépiniéristes en France, qui correspond à des variétés, économiquement, parmi les plus importantes. Ce matériel provient de quatre sites différents : les pépinières Baud (Vaison-la-Romaine), la collection variétale de Porquerolles (conservatoire botanique), un producteur de Perpignan et enfin le CEFECNRS de Montpellier (Tableau I).

Cinq échantillons représentant trois dénominations différentes sont particulièrement choisis pour cette étude. Il s'agit de Col de Dame blanche, Col de Dame grise et Col de Dame noire, ayant une même forme de réceptacle. Ces trois variétés correspondent au figuier domestique sans récolte de printemps ; elles partagent un même spectre alloenzymatique constitué par 4 loci polymorphes [33]. Elles ont toutes les mêmes caractères morphologiques, seule la couleur de l'épiderme des figues les différencie. Il s'agit très certainement d'un génotype unique et la différence de couleur notée serait le résultat de mutations somatiques maintenues par la multiplication végétative [33]. Pour chacune des deux variétés Col de Dame blanche et Col de Dame noire, l'analyse est réalisée sur deux échantillons provenant l'un de la collection variétale de Porquerolles, et l'autre de la zone traditionnelle de culture de ces variétés à Perpignan. Les deux échantillons d'une même variété ont ainsi été multipliés séparément dans deux localités géographiques différentes et ce, depuis fort longtemps. L'analyse de ces échantillons permettra de tester la stabilité des marqueurs RAPD au sein du génotype Col de Dame.

Extraction de l'ADN génomique

L'ADN est extrait selon la méthode de Dellaporta *et al* [12] à partir de bourgeons végétatifs dormants car, pendant l'hiver, le figuier est dépourvu de feuilles. Un test de comparaison entre ce type d'extraction et celui réalisé à partir de jeunes feuilles obtenues en serre montre qu'il n'existe aucune différence dans la qualité de l'ADN et les résultats obtenus. La quantité d'ADN génomique est estimée par spectrophotométrie et coloration au bromure d'éthidium après électrophorèse.

Tableau I. Liste des échantillons de figuier.

Numéro	Nom	Collection d'origine
1	Dauphine	Porquerolles
2	Violette Dauphine	Pépinières Baud
3	Col de Dame grise	Porquerolles
4	Col de Dame blanche (échantillon 1)	Porquerolles
5	Col de Dame noire (échantillon 1)	Porquerolles
6	Col de Dame noire (échantillon 2)	Perpignan
7	Bourgeassotte noire	Porquerolles
8	Violette de Sollies	Pépinières Baud
9	Marseillaise	Pépinières Baud
10	Verte d'Argenteuil	Pépinières Baud
11	Longue d'août	Pépinières Baud
12	Osborn Prolific	Pépinières Baud
13	Madeleine des deux Saisons	Pépinières Baud
14	Grise de Saint-Jean	Pépinières Baud
15	Tardive Août Turkey	Pépinières Baud
16	Sultane	Pépinières Baud
17	Noire voisine de la Sultane	Pépinières Baud
18	Grise ronde à chair rose	Pépinières Baud
19	Grosse longue verte	Pépinières Baud
20	Roscoff	CEFE-CNRS, Montpellier
21	Col de Dame blanche (échantillon 2)	Perpignan

Conditions de la PCR et de l'électrophorèse

Les amorces (Operon, USA) sont des oligonucléotides de 10 bases ayant une proportion en CG dépassant 50 % (Tableau II). La réaction d'amplification est réalisée dans un volume de 25 µl contenant 10 mM tris-HCl à pH 8,3 ; 50 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,001 % gélatine ; 100 µM pour chacun des désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP, Boehringer), environ 10 ng d'ADN génomique ; 0,4 µM d'amorce et une unité de Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus). Ce mélange est couvert par deux gouttes d'huile minérale (Sigma) pour empêcher l'évaporation du liquide lors de la réaction d'amplification qui est conduite dans un appareil Trio-ThermoBlock (Biometra/Allemagne). La réaction de PCR commence par une étape de dénaturation durant 5 mn à 95 °C ; elle est ensuite soumise à 45 cycles. Chaque cycle comporte 1 mn à 95 °C, 1 mn à 35 °C et 2 mn à 72 °C. La réaction de la PCR se termine par une étape d'élongation finale pendant 6 mn à 72 °C. Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % dans du tampon TBE 1X à 4 volts/cm pendant environ 4 h. Ils sont ensuite visualisés au bromure d'éthidium sous lumière UV (312 nm) et photographiés avec un film noir et blanc (667, Polaroid).

Tableau II. Liste des amorces utilisées dans l'analyse.

Code	Séquence 5' — 3'	Nombre de produits d'amplification	Nombre de marqueurs RAPD
OPA11	CAATCGCCGT	3	1
OPA16	AGCCAGCGAA	3	2
OPA18	AGGTGACCGT	4	2
OPH11	CTTCCGCAGT	5	2
OPK17	CCCAGCTGTG	6	2
OPX5	CCTTTCCTC	3	1
OPX9	GGTCTGGTTG	4	1
OPX11	GGAGCCTCAG	6	2
OPY4	GGCTGCAATG	3	1
OPY11	AGACGATGGG	6	2
OPY14	GGTCGATCTG	2	1
OPZ12	TCAACGGGAC	3	2

Analyse des données

Les produits d'amplification sont visualisés sur gel d'agarose sous la forme de bandes. A la suite d'un test de répétabilité, ces bandes sont codées sous la forme de présence/absence pour l'ensemble des individus analysés. La présence est notée quelle que soit l'intensité de la bande. Par commodité de langage, un marqueur RAPD est qualifié de locus à deux allèles (présence ou absence de la bande). L'analyse par ces marqueurs permet de caractériser chaque échantillon par un profil multilocus. La variation entre génotypes est évaluée en calculant l'indice de similarité de Nei et Li [27] pour l'ensemble des échantillons pris deux à deux selon la formule suivante : $S = 2 \times N_{AB} / (N_A + N_B)$ où N_{AB} est le nombre de bandes communes à l'individu A et à l'individu B, N_A et N_B correspondent respectivement au nombre de bandes de l'individu A et de l'individu B. La probabilité d'avoir un même profil multilocus pour deux individus pris au hasard peut être calculée par la moyenne de l'indice de similarité à la puissance de la moyenne du nombre de bandes par individu [29]. Les relations qui existent entre les génotypes sont illustrées par un dendrogramme construit à partir de la matrice de similarité de Nei et Li [27] en utilisant la méthode de la classification ascendante hiérarchique non pondérée sur le critère de la distance moyenne (UPGMA ; [5] et le logiciel Phylip [14].

Résultats et discussion

Sélection et validité des marqueurs RAPD

Un ensemble de 85 amorces est testé sur quatre échantillons : Dauphine, Col de Dame grise, Madeleine des deux saisons et Roscoff. Environ 25 % de ces amorces (21 au total) sont immédiatement exclues de cette étude car pour certaines, il y a absence totale

d'amplification et pour d'autres les produits d'amplification obtenus sont mal définis et difficilement interprétables. Parmi les 64 amorces retenues, 27 génèrent du polymorphisme (Figure 1). Chacune de ces amorces est ensuite testée une deuxième fois sur les quatre génotypes, puis une troisième fois sur l'ensemble des échantillons étudiés. Parmi les 14 premières amorces testées de cette manière, 12 sont retenues pour l'identification des génotypes étudiés car les produits d'amplification obtenus sont répétables à chacune de ces trois amplifications réalisées (Figure 2).

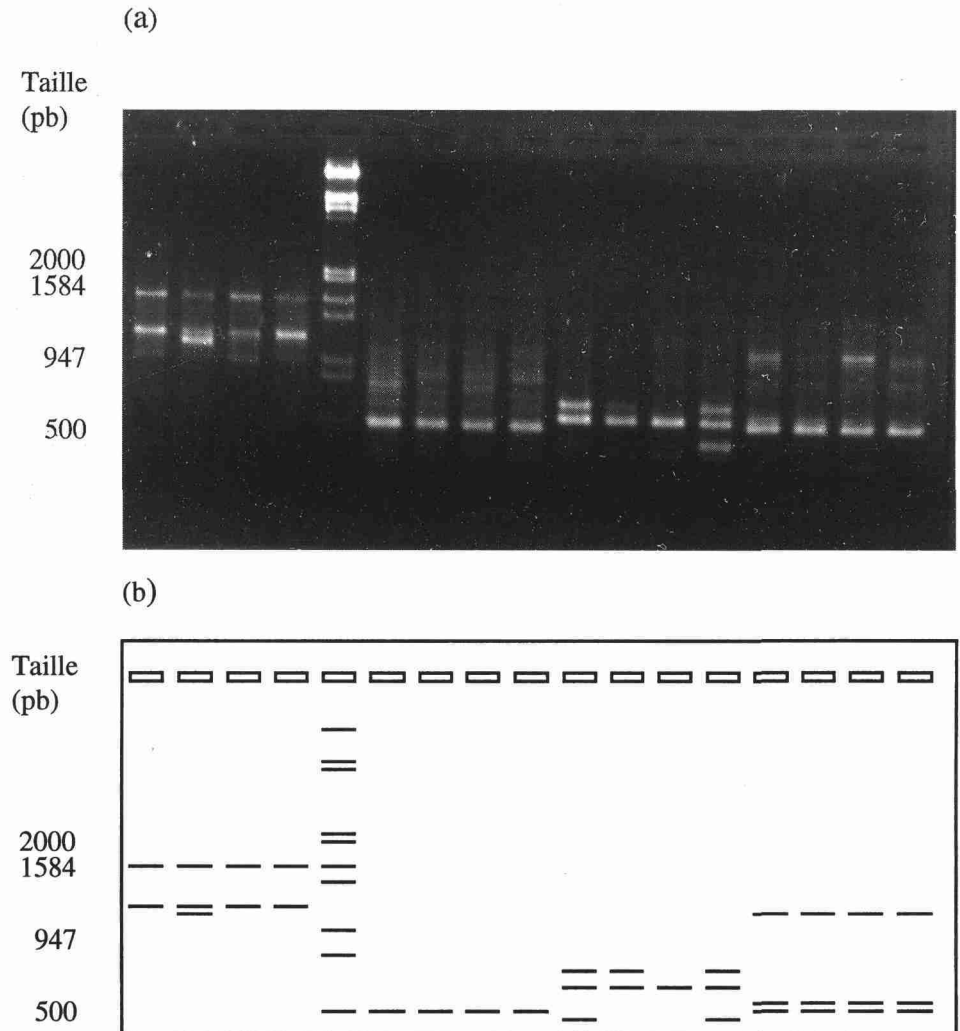


Figure 1. Exemple de sélection des amorces révélant du polymorphisme au sein de quatre génotypes (de gauche à droite : l'échantillon 20, 13, 3 et 1). Les amorces testées sont de gauche à droite : OPX5, OPX1, OPA18 et OPA9. (a) photographie du gel, (b) diagramme utilisant la présence de bandes.

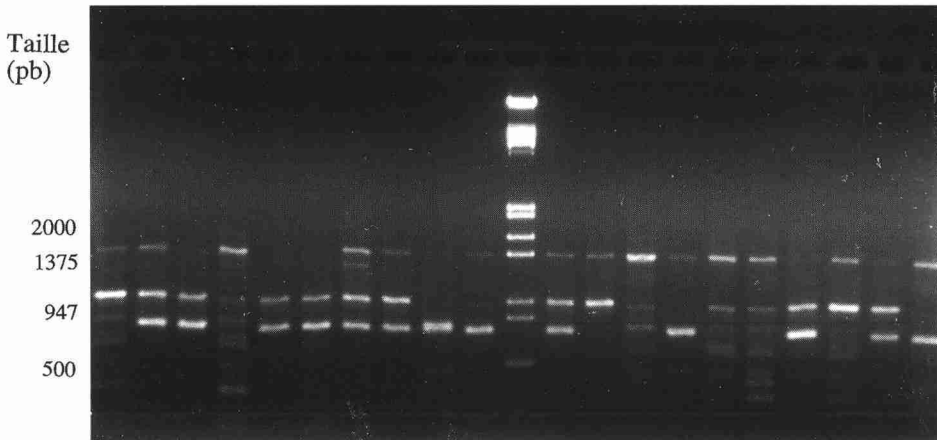


Figure 2. Exemple de produits d'amplification obtenus à partir de 20 échantillons de figuier (de gauche à droite : l'échantillon 1 jusqu'à 20) en utilisant l'amorce OPA16.

Un total de 64 produits d'amplification est obtenu par les 12 amorces utilisées dans cette étude dont 16 ne sont pas pris en compte (soit 25 % du total). 29 produits d'amplification (soit 45 % du total) sont présents chez l'ensemble des échantillons analysés, ils correspondent à des loci monomorphes. 19 produits d'amplification (soit 30 % du total) correspondent à des loci polymorphes, ils constituent l'ensemble des marqueurs RAPD utilisés pour l'identification des génotypes étudiés (Tableau II). Le nombre de produits d'amplification obtenus à l'aide d'une seule amorce varie de deux à six avec une moyenne de 4. Chacune de ces amorces permet d'avoir un à deux marqueurs RAPD (Tableau II).

L'utilisation des amorces de courte séquence rend la réaction de la PCR très sensible aux conditions de l'amplification. De ce fait, des résultats reproductibles ne sont obtenus que dans le cas où ces conditions sont optimales et strictement les mêmes pour les différentes réactions [15,42]. Les marqueurs RAPD utilisés dans cette étude sont le résultat d'une sélection sur les amorces et sur les produits d'amplification. En effet, la présence de résultats non reproductibles montre l'importance de cette sélection [45].

La possibilité d'une co-migration des fragments d'ADN amplifiés constitue, dans certains cas, une difficulté pour l'interprétation des résultats RAPD. L'utilisation de l'un des fragments amplifiés comme sonde permet par hybridation de vérifier s'il s'agit du même locus [41]. Les marqueurs utilisés dans cette analyse n'ont pas été vérifiés selon cette méthode. Cependant, nous avons montré que le marqueur OPY14 a une transmission biparentale au niveau de la génération F1 (résultats non publiés). Les autres marqueurs ne sont pas testés car ils ne sont pas polymorphes entre les deux parents étudiés. De plus, la probabilité d'avoir une co-migration pour des individus appartenant à une même espèce, comme dans ce cas, est faible [19].

Polymorphisme et identification des génotypes

L'analyse des 21 échantillons de figuier par ces marqueurs permet de distinguer 17 profils multilocus différents (Figure 3). Une même combinaison de bandes est commune à quatre échantillons de Col de Dame, à l'exception de Col de Dame blanche

provenant de Porquerolles. Les marqueurs RAPD sont donc parfaitement stables pour différents clones d'un même génotype. Cette stabilité caractérise la variété Col de Dame noire pour laquelle deux échantillons sont multipliés séparément dans deux localités géographiques différentes depuis de nombreuses années. Elle caractérise aussi les trois variétés obtenues par mutation somatique à partir d'un génotype unique Col de Dame. De la même manière, Wolff et Peters-Van Rijn [43] obtiennent un seul profil multilocus pour 13 cultivars de chrysanthèmes (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) issus d'un même clone d'origine. L'échantillon Col de Dame blanche provenant de Porquerolles est caractérisé par une combinaison de bandes très différente des autres Col de Dame. En effet, l'indice de similarité de 0,57 entre ces deux génotypes traduit une différence sur 9 marqueurs (Tableau III). Il s'agit donc d'une erreur d'étiquetage dans la collection. Quant à l'échantillon Bourgeassotte noire et Violette de Sollies qui ont le même profil multilocus, il s'agit, après une enquête réalisée auprès des responsables de collections, d'un même génotype ayant deux nominations différentes selon la provenance. La Figure 3 montre qu'aucun génotype n'est caractérisé par un seul marqueur.

Les marqueurs RAPD utilisés ont permis d'identifier l'ensemble des échantillons analysés. Cette identification est fondée par le fait que les 17 profils multilocus se distinguent par au moins trois allèles (Tableau III, Figure 3). Par ailleurs, la probabilité pour que deux individus différents partagent une même combinaison de bandes est infime, de l'ordre de $5,10^{-3}$ (0,61^{10,67}). L'utilisation de 19 marqueurs RAPD prévoit, dans le cas où ces marqueurs ne sont pas liés, un total de 524 288 (2^{19}) combinaisons multilocus différentes possibles. De telles possibilités sont difficilement réalisées par l'emploi des alloenzymes dont le polymorphisme est limité par le nombre de loci et d'allèles généralement faibles [2, 30, 33, 35]. Bailey [3] définit trois critères pour l'identification variétale : 1) une variation suffisamment importante pour distinguer les différentes variétés, 2) une variation intra-variétale minimale, 3) une reproductibilité dans les résultats. En remplissant ces trois conditions, les marqueurs RAPD utilisés dans notre étude sont donc bien adaptés à l'identification des génotypes.

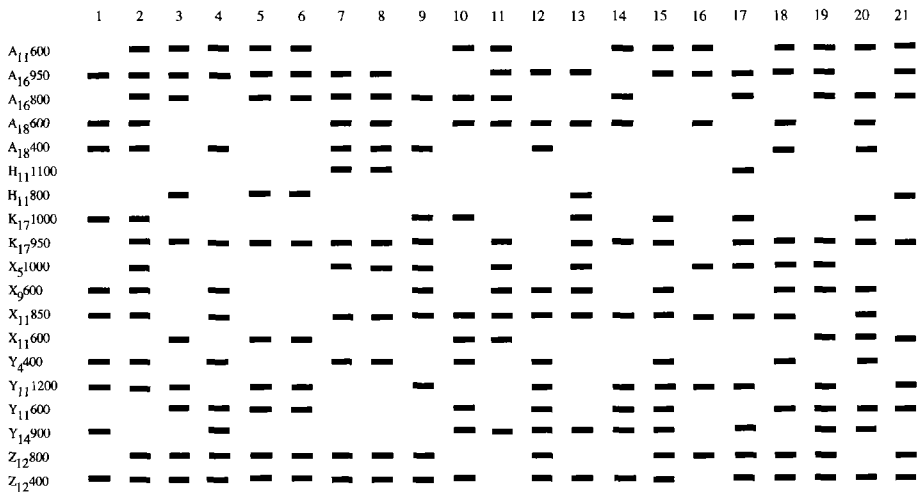


Figure 3. Diagramme illustrant les différents profils multilocus des 21 échantillons étudiés.

Tableau III. Matrice de similarité basée sur l'estimation de l'indice de similarité de Nei & Li [27]. Moyenne = 0,61, erreur standard = 0,14.

Échantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Dauphine	1,00																				
Violette Dauphine	0,75	1,00																			
Col de Dame grise	0,30	0,58	1,00																		
Col de Dame blanche (éch.1)	0,67	0,72	0,57	1,00																	
Col de Dame noire (éch.1)	0,30	0,58	1,00	0,57	1,00																
Col de Dame noire (éch.2)	0,30	0,58	1,00	0,57	1,00	1,00															
Bourgassotte noire	0,57	0,80	0,48	0,64	0,48	0,48	1,00														
Violette de Solhies	0,57	0,80	0,48	0,64	0,48	0,48	1,00	1,00													
Marseillaise	0,60	0,83	0,50	0,57	0,50	0,50	0,67	0,63	1,00												
Verte d'Argenteuil	0,60	0,58	0,50	0,57	0,50	0,50	0,48	0,48	0,40	1,00											
Longue d'août	0,50	0,67	0,50	0,57	0,50	0,50	0,57	0,57	0,50	0,60	1,00										
Osborn Prolific	0,86	0,72	0,48	0,82	0,48	0,48	0,64	0,64	0,57	0,57	0,48	1,00									
Madeleine des deux Saisons	0,70	0,67	0,40	0,57	0,40	0,40	0,57	0,57	0,60	0,50	0,70	0,57	1,00								
Grise de Saint-Jean	0,53	0,60	0,63	0,60	0,63	0,63	0,50	0,50	0,53	0,74	0,63	0,60	0,53	1,00							
Tardive Brown Turkey	0,73	0,77	0,64	0,91	0,64	0,64	0,52	0,52	0,64	0,64	0,55	0,78	0,64	0,67	1,00						
Sultane	0,47	0,67	0,47	0,47	0,47	0,47	0,56	0,56	0,47	0,35	0,59	0,56	0,47	0,50	0,53	1,00					
Noire voisine de la Sultane	0,57	0,72	0,57	0,57	0,57	0,57	0,73	0,73	0,76	0,48	0,57	0,50	0,67	0,60	0,73	0,56	1,00				
Grise ronde à chair rose	0,64	0,85	0,54	0,91	0,54	0,54	0,78	0,78	0,64	0,54	0,64	0,78	0,63	0,57	0,75	0,63	0,52	1,00			
Grosse longue verte	0,45	0,69	0,82	0,73	0,82	0,82	0,52	0,52	0,64	0,54	0,73	0,61	0,55	0,67	0,75	0,53	0,70	0,67	1,00		
Roscoff	0,70	0,74	0,52	0,78	0,52	0,52	0,58	0,58	0,61	0,87	0,70	0,67	0,61	0,80	0,72	0,30	0,50	0,72	0,64	1,00	
Col de Dame blanche (éch. 2)	0,30	0,58	1,00	0,57	1,00	1,00	0,48	0,48	0,50	0,50	0,50	0,48	0,40	0,63	0,64	0,47	0,57	0,54	0,82	0,52	1,00

L'identification de 21 individus de figuier pourrait être réalisée par un choix de 5 à 6 marqueurs indépendants. Or, il faut au moins 17 marqueurs, puisque les deux génotypes les plus proches ($S = 0,91$) ont en commun 16 allèles (Tableau III, Figure 3). Le fait que ce nombre de marqueurs nécessaire est multiplié par un facteur de 3 suggère que certains de ces loci sont liés, et/ou qu'un sous-ensemble de combinaisons multilocus n'est pas représenté sous l'effet de l'échantillonnage. Le nombre de marqueurs à utiliser dans ce type d'étude est important puisqu'il s'agit de pouvoir séparer les différents génotypes par le minimum de marqueurs possibles afin d'économiser le coût d'analyse [23].

Variabilité génétique chez le figuier

Les 12 amorces utilisées dans cette étude ont donné 48 produits d'amplification répétables, soit 4 produits d'amplification par amorce en moyenne. Ce nombre est faible comparé à celui obtenu chez d'autres espèces [16, 22, 26, 43, 45]. L'obtention d'un tel résultat limite le nombre de marqueurs RAPD qui est en moyenne de 1,5 chez le figuier (Tableau II). Dans un cas comme le pommier où une seule amorce a donné 14 produits d'amplification [22], les 19 marqueurs peuvent être obtenus par 2 à 4 amorces contrairement aux 12 amorces utilisées dans notre étude. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en augmentant la résolution des produits d'amplification, permet d'avoir plus de marqueurs RAPD que l'électrophorèse sur gel d'agarose [6, 13].

Sur un ensemble de 85 amorces testées, 27 ont révélé du polymorphisme (soit 29 %). Ce polymorphisme est plus faible que celui obtenu chez d'autres espèces [16, 25, 39, 45]. Il était donc nécessaire de procéder à une première sélection d'amorces révélant du polymorphisme au sein d'un sous-ensemble de 4 génotypes. Cette méthode a permis d'économiser les coûts et le temps en évitant d'analyser inutilement l'ensemble des échantillons par des amorces non informatives. Néanmoins, le polymorphisme révélé par l'utilisation des amorces sélectionnées est étroitement lié à la base génétique formée par ces quatre génotypes. Il peut, de ce fait, introduire un biais dans l'analyse de la variabilité génétique de l'ensemble des échantillons. L'indice de similarité moyen pour ces 4 génotypes est de 0,54 ; il n'est guère différent de l'indice moyen pour l'ensemble des échantillons qui est de 0,61. Ces 4 génotypes constituent alors un sous-ensemble représentatif de la variabilité génétique existant au sein de l'ensemble des échantillons. De ce fait, le choix de ces génotypes n'introduit pas de biais quant à l'analyse de la variabilité.

La matrice résultant du calcul de l'indice de similarité pour l'ensemble des échantillons pris deux à deux (Tableau III) montre que cet indice varie de 0,30 à 0,91 pour les génotypes ainsi identifiés, avec une moyenne d'environ 0,61, et une variation de 23 %. Les génotypes caractérisés partagent alors une base génétique relativement large. Cependant, l'apparementement entre ces individus, illustré par le dendrogramme (Figure 4) montre qu'il n'y a pas de groupement de génotypes bien individualisés. Les travaux de Van Heusden et Bachmann [34] montrent que chez *Microseris elegans*, 10 génotypes dont chacun est caractéristique d'un biotope et d'une population, sont nettement séparés en 4 groupes, alors que leur indice de similarité ne varie que de 0,48 à 0,91 avec une moyenne de 0,64 et une variation de 20 %. Cette séparation en groupes est en rapport avec la distribution géographique des populations de *Microseris elegans* ainsi que le flux de gènes relativement limité. La variabilité génétique existant au sein des génotypes de figuier n'est pas structurée, malgré un indice de similarité qui varie de 0,30 à 0,91, probablement sous l'effet d'un important brassage de gènes.

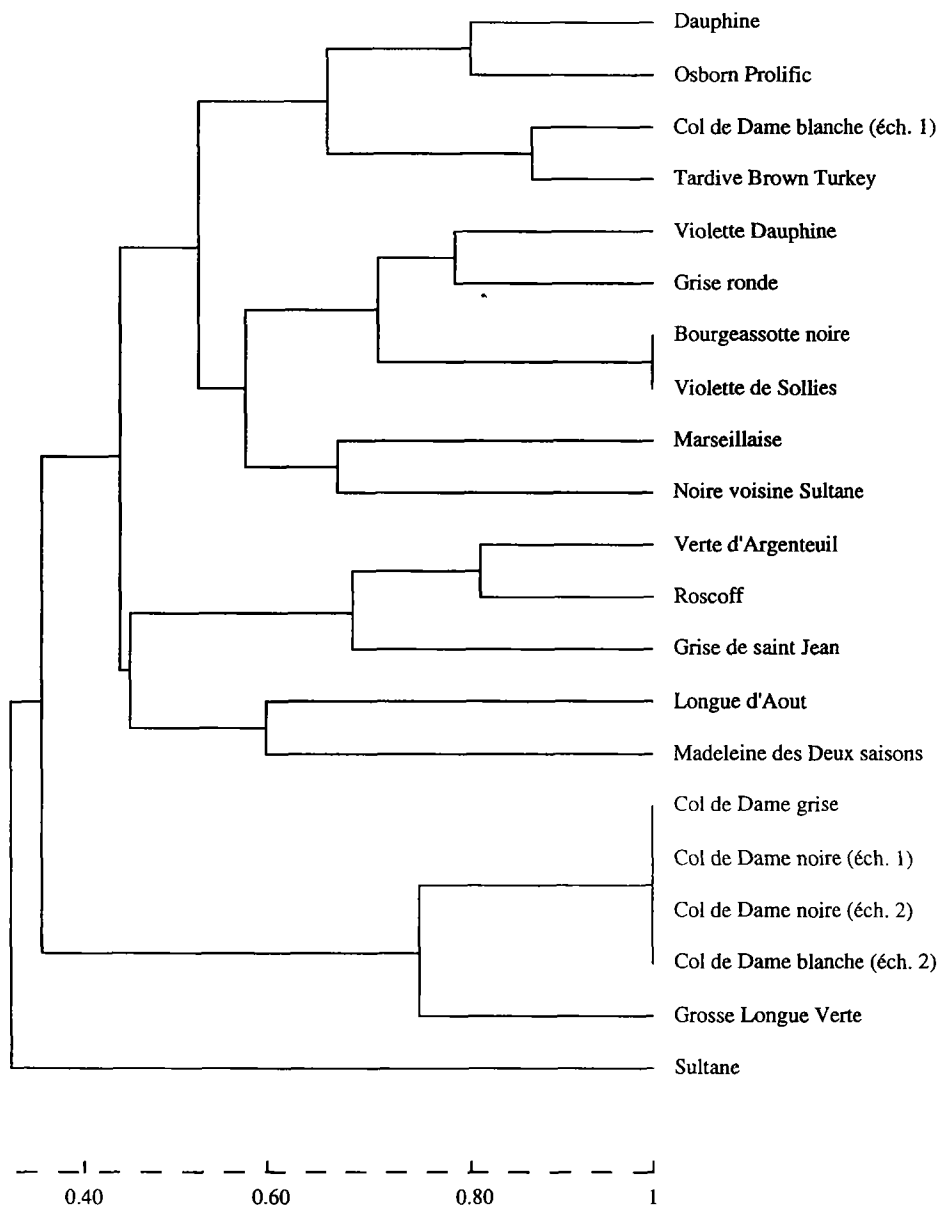


Figure 4. Dendrogramme construit par UPGMA à partir de l'indice de similarité de Nei et Li [27].

Conclusion

Cette étude montre que l'application des marqueurs RAPD pour l'identification de variétés au sein d'une collection est possible. Elle a permis de caractériser les marqueurs qui peuvent servir pour identifier l'ensemble des échantillons présents dans une collection comme celle du conservatoire botanique de Porquerolles. En effet, les 19 marqueurs déterminés permettent d'obtenir, sous l'hypothèse d'indépendance, 524 288 (2^{19}) profils multilocus différents. Un ensemble de 500 échantillons devrait facilement être identifié. Cette technique offre, en outre, l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et permet d'éviter l'emploi de la radioactivité et d'obtenir rapidement des résultats [28]. Cependant, elle présente l'inconvénient d'être très sensible au moindre changement dans les conditions de PCR. Bien que travaillant avec les mêmes conditions optimales, il arrive parfois que la PCR soit médiocre ou absente, ce qui montre que certains paramètres ne sont pas encore maîtrisés [44]. En vue d'obtenir des résultats reproductibles, il est donc primordial de faire une sélection intense sur les amorces et sur les produits d'amplification.

Cette étude montre que ces génotypes ont une base génétique relativement large sans différenciation en groupes distincts. La variabilité non structurée obtenue est due probablement à un brassage de gènes, mais le faible nombre d'échantillons analysés, pour l'essentiel d'origine française, ne permet pas de tester cette hypothèse. Condit [10] dénombre un peu plus de 600 variétés de figuier provenant de différents pays méditerranéens. Il serait donc intéressant d'élargir l'étude à un plus grand nombre de variétés issues de régions différentes et de comparer les résultats obtenus à d'autres études sur la variabilité génétique des populations naturelles de *Ficus carica*. Cependant, les marqueurs RAPD présentent l'inconvénient d'être dominants car la présence d'un fragment d'ADN amplifié ne permet pas de distinguer un hétérozygote d'un homozygote [7, 15]. Dans ces conditions, les études de génétique des populations, qui sont importantes pour comprendre les flux de gènes au sein des populations, sont difficilement réalisables. Néanmoins, des premiers travaux utilisant les marqueurs RAPD pour l'étude de la différenciation génétique entre populations naturelles montrent l'intérêt de ces marqueurs dans ce type d'études [8, 17, 26, 34]. La comparaison de la diversité génétique entre les génotypes cultivés et les populations naturelles conduit à l'évaluation des ressources génétiques de l'espèce. Ces connaissances permettront de savoir s'il faut élargir le pool génétique des collections, et d'établir une stratégie d'échantillonnage dans les populations naturelles. Une étude utilisant à la fois les marqueurs RAPD et les alloenzymes permettrait de mieux comprendre les relations génétiques entre plantes cultivées et sauvages de *Ficus carica*.

Remerciements : ce travail a été principalement réalisé au Laboratoire des Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales, ORSTOM, Montpellier ; que le Pr A. Charrier, M. S. Hamon et M. A. Ghesquière soient remerciés pour leur accueil. Les auteurs tiennent à remercier les trois fournisseurs des échantillons de figuier (P. Baud, P. Llenas, J. P. Roger). Ils remercient également G. Laurent pour la mise en culture sous serre du matériel végétal, M. Ch. Gavalda et Ph. Marmey pour l'aide technique qu'ils ont apportée aux analyses. Ce travail a été financé par le contrat INRA-CEE, n° D.G. VI-CT 91105.

Références

1. Arnold ML, Buckner CM, Robinson JJ (1991). Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 1398-1402.
2. Atkinson MD, Withers LA, Simpson MJA (1986). Characterisation of cacao germplasm using isoenzyme markers. *Euphytica* 35 : 741-750.
3. Bailey DC (1983). Isozymic variation and plant breeders' rights. In : Tanksley SD, Orton TJ, eds. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Part A. Elsevier, Amsterdam : 425-441.
4. Beckmann JS, Soller M (1983). Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement : methodologies, mapping and cost. *Theor Appl Genet* 67 : 33-43.
5. Benzecri JP (1973). L'analyse des données. *La taxonomie*, tome I. Paris, Dunod, 616 p.
6. Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary primers. *Bio/Technology* 9 : 553-557.
7. Carlson JE, Tulsieram LK, Glaubitz JC, Luk VWK, Kauffeldt C, Rutledge R (1991). Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor Appl Genet* 83 : 194-200.
8. Chalmers KJ, Waugh R, Sprent JI, Simons AJ, Powell W (1992). Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69 : 465-472.
9. Condit IJ (1950). Figs characters as affected by climate. *Am Soc Hort Sci Proc* 44 : 211-214.
10. Condit IJ (1955). Figs varieties : a monograph. Hilgardia, Berkeley 23 : 323-538.
11. Dallas JF (1988). Detection of DNA « fingerprints » of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite probe. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 6831-6835.
12. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA preparation. Version II. *Plant Mol Biol Rep* 4 : 19-21.
13. Dweikat I, Mackenzie S, Levy M, Ohm H (1993). Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor Appl Genet* 85 : 497-505.
14. Felsenstein J (1987). Phylip, ver. 3.0 (computer software and manual). Dept. genetics. University of Washington, Seattle, W.A. 98195, USA.
15. Hadrys H, Balick M, Schierwater B (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1 : 55-63.
16. Hu J, Quiros CF (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep* 10 : 505-511.
17. Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.). *Theor Appl Genet* 86 : 927-934.
18. Hunt GJ, Page REJr (1992). Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theor Appl Genet* 85 : 15-20.
19. Kazan K, Manners JM, Cameron DF (1993). Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* 85 : 882-888.
20. Kjellberg F, Gouyon PH, Ibrahim M, Raymond M, Valdeyron G (1987). The stability of the symbiosis between dioecious figs and their pollinators : a study of *Ficus carica* L. and *Blas-tophaga psenes* L. *Evolution* 41 : 693-704.
21. Klein-Lankhorst RM, Vermunt A, Weide R, Liharska T, Zabel P (1991). Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor Appl Genet* 83 : 1549-1551.
22. Koller B, Lehmann A, McDermott JM, Gessler C (1993). Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 85 : 901-904.
23. Kresovich S, Williams JGK, McFerson JR, Routman EJ, Schaal BA (1992). Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor Appl Genet* 85 : 190-196.

24. Lashermes Ph, Cros J, Marmey Ph, Charrier A (1993). Use of random amplified polymorphic DNA markers to analyse genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Crop Evol Genet Ress* 40 : 91-99.
25. Marmey Ph, Beeching JR, Hamon S, Charrier A (soumis). Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of african cassava *Manihot esculenta* Crantz. *Crop Evol Genet Ress*.
26. Mosseler A, Egger KN, Hughes GA (1992). Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Can J For Res* 22 : 1332-1337.
27. Nei M, Li WH (1979). Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 5267-5273.
28. Newbury HJ, Ford-Lloyd BV (1993). The use of RAPD for assessing variation in plants. *Pl Grow Reg* 12 : 43-51.
29. Nybom H, Hall HK (1991). Minisatellite DNA « fingerprints » can distinguish *Rubus* cultivars and estimate their degree of relatedness. *Euphytica* 53 : 107-114.
30. Ouazzani N, Lumaret R, Villemur P, Di Giusto F (1993). Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europea* L.). *J Heredity* 84 : 34-42.
31. Reiter RS, Williams JGK, Feldmann K, Rafalski JA, Tingey SV, Scolnik PA (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 1477-1481.
32. Valdeyron G, Valizadeh M (1976). L'identification variétale du figuier, *Ficus carica* L. par l'étude du polymorphisme enzymatique par électrophorèse. *CR Acad Agri* 62, 3 : 170-175.
33. Valizadeh M, Rivals P, Valdeyron G (1977). Utilisation du polymorphisme protéique pour l'étude des variétés de figuier (*Ficus carica* L.). *CR Acad Agri* 63, 10 : 647.
34. Van Heusden AW, Bachmann K (1992). Genotype relationships in *Microseris elegans* (Asteraceae, Lactuceae) revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). *Pl Syst Evol* 179 : 221-233.
35. Weeden NF, Lamb RC (1985). Identification of apple cultivars by isoenzyme phenotypes. *J Am Soc Hortic Sci* 110 : 509-515.
36. Weising K, Ramser J, Kaemmer D, Kahl G, Epplen JT (1991). In : Burke T, Dolf J, Jeffreys AJ, Wolff R, eds. *DNA fingerprinting : approaches and applications*.
37. Welsh J, McClelland M (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18 : 7213-7218.
38. Welsh J, Honeycutt RJ, McClelland M, Sobral BWS (1991). Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor Appl Genet* 82 : 473-476.
39. Wilde J, Waugh R, Powell W (1992). Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* 83 : 871-877.
40. Wilkie SE, Isaac PG, Slater RJ (1993). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor Appl Genet* 86 : 497-504.
41. Williams JGK, Kubelik AR, Kenneth JL, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 : 22, 6531.
42. Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* 51 : 704-740.
43. Wolff K, Peters-Van Rijn J (1993). Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity* 71 : 335-341.
44. Wolff K, Schoen ED, Peters-Van Rijn J (1993). Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. *Theor Appl Genet* 86 : 1033-1037.
45. Yang X, Quiros C (1993). Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 86 : 205-212.

42

Amélioration génétique du palmier dattier assistée par les marqueurs biochimiques et moléculaires

M. BAAZIZ, K. BENDIAB

*Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire des Plantes,
Département de Biologie, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences,
BP S 15, Marrakech, Maroc.*

Résumé

Le palmier dattier, Phoenix dactylifera L., monocotylédone pérenne, est menacé de disparition au nord de l'Afrique par une fusariose vasculaire, appelée « Bayoud ». Ce sont les cultivars de haute qualité dattière qui sont les plus sensibles à la maladie. Les programmes d'amélioration génétique de la plante visent, généralement, l'obtention de palmiers résistants au Bayoud et de bonne qualité fruitière. Les croisements dirigés entre les cultivars résistants au Bayoud et les palmiers mâles résistants ou sensibles à la maladie donnent naissance à des génotypes différents pouvant allier la résistance à la fusariose et la bonne qualité des fruits. L'électrophorèse d'extraits enzymatiques de feuilles sur gel de polyacrylamide, suivie de la révélation in situ de différentes isoenzymes, permet d'évaluer la diversité des populations F1. L'étude de 3 loci montrant le caractère d'hybrides, et qui sont à l'origine des activités enzymatiques des estérases (EST-1), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT-2) et endopeptidases (ENP), permet une meilleure prédiction des génotypes parentaux connaissant la population F1 qui en résulte et inversement. L'association (linkage) des gènes de la résistance au Bayoud, avec les 7 allozymes transmis selon une ségrégation mendélienne, sera d'un grand apport dans la lutte contre la maladie du Bayoud décimant le palmier dattier.

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), espèce pérenne, est, par tradition, multiplié par plantation de rejets produits à la base des différents cultivars. Ce mode de propagation tend à conserver la conformité génétique des plantes. Ainsi, les cultivars de très bonne qualité dattière, tels que Bou-Feggous et Mejhoul, ont été reproduits et domestiqués au fil des années. L'apparition de la maladie du Bayoud, fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* [9, 13], a montré que les cultivars de haute qualité dattière sont les plus sensibles au Bayoud. De plus, la plantation de rejets non suffisamment désinfectés contribue à la propagation du champignon causal de la maladie. Dès lors, la nécessité d'une amélioration génétique du palmier dattier commença à s'imposer. Elle doit viser l'obtention de palmiers résistants au Bayoud et de bonne qualité dattière, pouvant être cultivés même sur des sols contaminés par le champignon. Comme la résistance au Bayoud est liée à des caractères indésirables et que le greffage de cultivars de haute qualité dattière sur des cultivars résistants reste impossible, l'obtention de palmiers associant les bons traits de résistance et de qualité fruitière doit passer par des croisements dirigés utilisant un ou plusieurs géniteurs de résistance. Au Maroc, six cultivars, seulement, sont reconnus résistants au Bayoud [10]. En Algérie, seule la variété Takerboucht, présente en effectif réduit, est résistante.

Afin d'identifier facilement les géniteurs de résistance, les palmiers utilisés dans les croisements dirigés et les jeunes plants qui en résultent, l'utilisation de marqueurs biochimiques et moléculaires s'avère nécessaire. En effet, le palmier dattier présente une croissance très lente et la fructification survenant après 5 à 7 ans de culture reste l'étape capitale dans l'identification variétale. Ainsi, de nombreuses analyses ont été réalisées sur plusieurs organes de la plante, tels que les feuilles [2, 3, 5, 7, 13], les fruits [1, 11] et les graines [8].

Le succès dans la création de nouvelles variétés par des croisements dirigés est lié à la connaissance du mode de transmission des traits agronomiques recherchés. Ainsi, l'obtention de marqueurs biochimiques et moléculaires transmissibles selon la loi de Mendel est d'un grand apport dans l'amélioration génétique du palmier dattier [6, 12]. En effet, l'association étroite d'au moins un marqueur avec, par exemple, les gènes gouvernant la résistance au Bayoud permet, en détectant le(s) marqueur(s) dans la descendance, de suivre la transmission de la résistance à cette fusariose vasculaire.

Dans cet exposé, une clef d'identification des cultivars de palmier dattier est expliquée. Elle est basée sur l'étude électrophorétique des systèmes enzymatiques constitués par les estérases (EST), la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et les endopeptidases (ENP). La mise en évidence de loci montrant le caractère d'hybrides avec des allèles à ségrégation mendélienne a permis d'identifier les plants des populations F1 résultant de 7 croisements dirigés.

Matériel et méthodes

Les folioles de la couronne moyenne du bouquet foliaire de 29 cultivars de palmier dattier proviennent de Zagora (sud du Maroc). Elles correspondent aux variétés : Admou (ADM), Aguellid (AGL), Ahardane (AHD), Bou-Cerdoun (BCD), Bou-Feggous (BFG), Bou-Feggous ou Moussa (BFGM), Bou-Ijjou (BIJ), Bou-Ittob (BIT), Bou-Sli-khene (BSL), Bou-Skri (BSK), Bou-Sthammi noire (BSTN), Bou-Sthammi blanche (BSTB), Bou-Temda (BTD), Bou-Zeggar (BZG), Haoua (HOA), Iklane (IKL), Jihel (JHL), Mah-Lbaid (MLB), Mejhoul (MJH), Mekt (MKT), Mest-Ali (MST), Oum-N'hal (OMH), Outoukdim (OTK), Race-Lahmar (RLM), Sair-Layalet (SLY), Tadment

(TDMT), Bel-Hazit (BAZ), Azigzao (AZO) et Aissa-Youb (AIB). Six cultivars sont très résistants au Bayoud. Ce sont BSTN, IKL, TDMT, BFGM, BSTB et SLY. Les cultivars BFG, MJH, JHL et BSK sont très sensibles à la fusariose. Plusieurs variétés telles que BSL, BZG, MLB et OTK sont de résistance intermédiaire. Les meilleures dattes sont données par les cultivars sensibles au Bayoud, comme MJH, BFG et AGL.

Dans le but d'obtenir des populations F1 de jeunes plants de palmier dattier, plusieurs croisements dirigés ont été effectués, d'une part entre 4 cultivars résistants au Bayoud et de faible à moyenne qualité dattière (IKL, BSTN, SLY et BSL), et un mâle (M-2, INRA) et d'autre part, entre 3 cultivars sensibles de bonne qualité dattière (BSK, JHL et AGL) et un mâle (M-1, INRA). Les graines provenant des différents croisements sont mises en germination et les jeunes plants qui en résultent sont cultivés en serre jusqu'au stade 2 feuilles.

Les méthodes d'extraction des enzymes à partir des feuilles de palmier dattier, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et la révélation des isoenzymes ont été décrites dans des travaux antérieurs [5, 6].

Résultats et discussion

L'électrophorèse d'extraits enzymatiques, préparés à partir des folioles de palmiers adultes et des feuilles de jeunes plants issus de graines, a permis d'obtenir des zymogrammes nets pour les 3 enzymes étudiées (EST, GOT et ENP). Dans une première étape, l'interprétation des zymogrammes a été faite sur la base des phénotypes électrophorétiques qui résultent de l'expression d'au moins un gène pour chaque enzyme. L'inventaire des phénotypes obtenus pour chaque enzyme est montré dans la Figure 1. Ainsi, les estérases (EST), la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et les endopeptidases (ENP) présentent, respectivement, 11, 8 et 5 phénotypes. A l'exception des ENP migrant en une seule zone dans le gel, les EST et la GOT montrent 2 zones de migration notées, respectivement, GOT-1 et GOT-2 puis EST-1 et EST-2. Les phénotypes ayant plus de bandes d'activité sont A, B, J et K pour les EST ; A, B, G et H pour la GOT et A, D et E pour les ENP.

Afin d'exploiter les zymogrammes sur le plan génotypique, des loci à déterminisme génétique simple ont été définis [5]. Ainsi, les zones d'activité GOT-2 et EST-1 correspondent, chacune, à un locus codant pour une molécule dimérique avec 2 allèles. Les endopeptidases résultent de l'expression d'un locus à l'origine d'une enzyme monomérique avec 3 allèles. Les génotypes qui résultent de la ségrégation des allèles sont résumés dans la Figure 2. Le locus *ENP* donne naissance à 6 génotypes différents dont 3 hétérozygotes (A'B', A'C' et B'C') et 3 homozygotes (A'A', B'B' et C'C'). Les loci *EST-1* et *GOT-2* montrent, chacun, trois génotypes où les hétérozygotes sont A'B'. Ainsi, dans le cas des EST et de la GOT, un génotype peut être rencontré dans plusieurs phénotypes. Par exemple, le génotype A'B' de la GOT est retrouvé dans les phénotypes électrophorétiques A, B et G de la même enzyme. Les homozygotes A'A' et B'B' du locus EST-1 sont représentés, respectivement, par les phénotypes F, G et H, d'une part et C, D, E et I, d'autre part.

Afin d'identifier les cultivars de palmier dattier, géniteurs de résistance ou porteurs d'autres traits agronomiques, une clef d'identification de 29 cultivars des palmeraies du sud du Maroc a été établie sur la base des phénotypes électrophorétiques (Figure 3). Chaque cultivar est reconnu par la succession de 3 phénotypes isoenzymatiques détec-

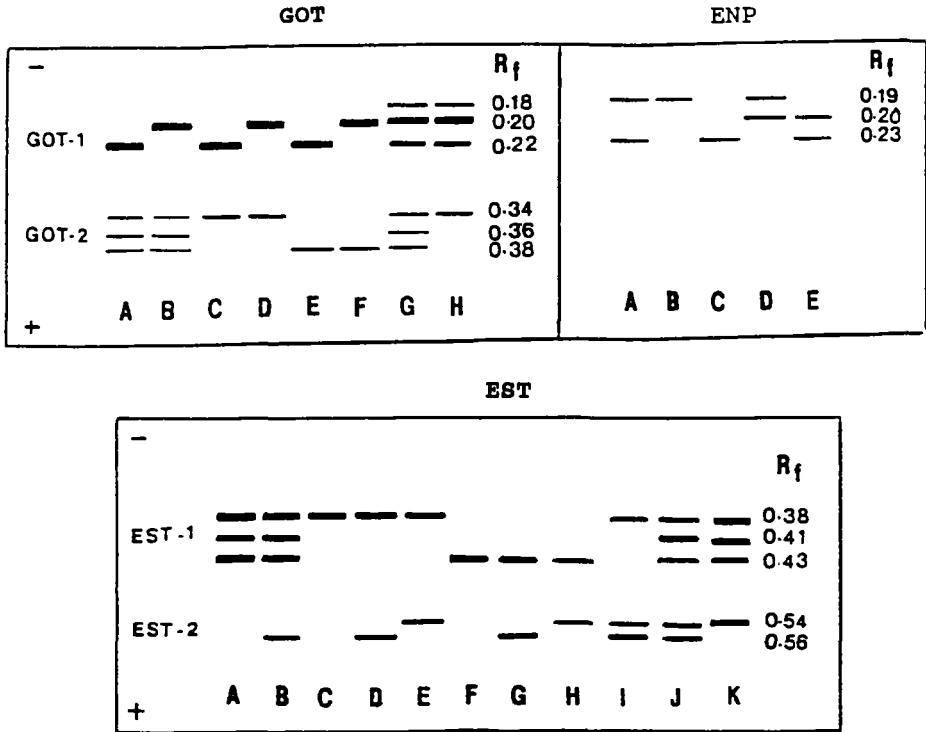


Figure 1. Phénotypes électrophorétiques (A-L) des systèmes enzymatiques constitués par la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), les endopeptidases (ENP) et les estérases (EST), révélés au niveau des feuilles de palmier dattier.

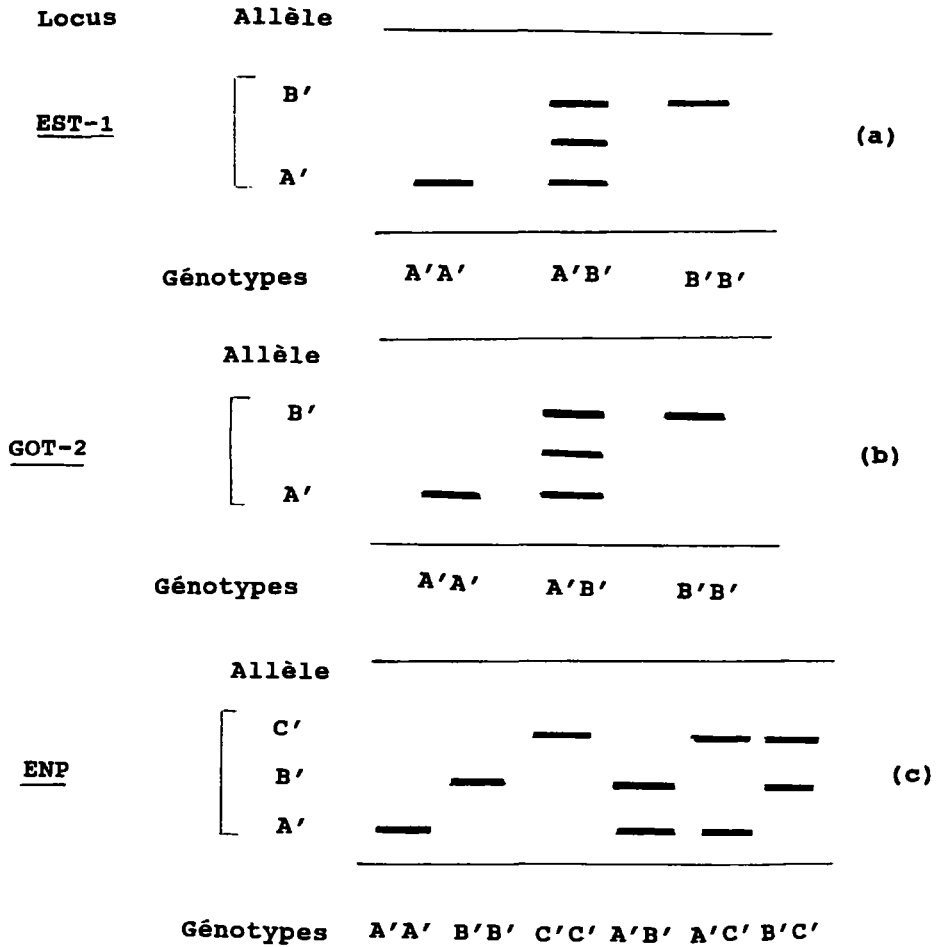


Figure 2. Interprétation génétique des isoenzymes correspondant aux loci *EST-1* (a), *GOT-2* (b) et *ENP* (c) correspondant, respectivement, aux estérases, glutamate oxaloacétate transaminase et endopeptidases révélées au niveau des feuilles du palmier dattier.

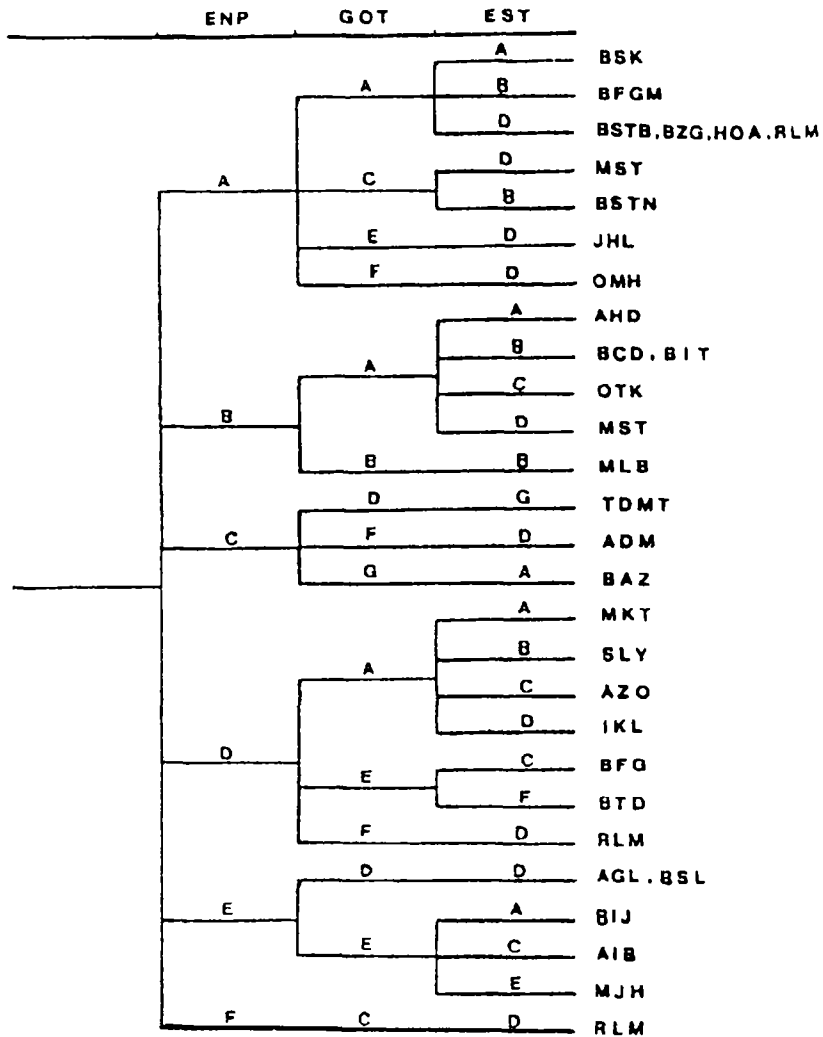


Figure 3. Clef d'identification de 29 cultivars de palmier dattier basée sur les phénotypes électrophorétiques (A-G) des endopeptidases (ENP), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et estérases (EST), révélés au niveau des folioles de palmiers adultes.

tés au niveau des folioles. Ainsi, la variété MJH, de très bonne qualité dattière, est caractérisée par le phénotype E pour l'ensemble des enzymes. Les 6 cultivars très résistants (BFGM, BSTB, BSTN, TDMT, SLY et IKL) présentent 3 phénotypes pour les ENP ; A pour BFGM, BSTB et BSTN, C pour TDMT et D pour IKL et SLY. Une proportion de 70 % des cultivars peut être caractérisée. Néanmoins, certaines variétés peuvent former des groupes de mêmes phénotypes. Ainsi, le cultivar AGL reste associé au cultivar SLY. Aussi, 2 cultivars, RLM et MST, montrent plusieurs successions de phénotypes isoenzymatiques, démontrant leur variabilité et la difficulté de leur caractérisation. La clef d'identification variétale du palmier dattier est d'un grand apport dans la caractérisation des jeunes palmiers n'ayant pas atteint le stade de fructification. Elle permet également d'estimer la conformité génétique des jeunes plants issus de la culture de tissus et d'orienter le choix du matériel végétal pour de nouvelles plantations dans les palmeraies dévastées par le Bayoud.

La multiplication végétative du palmier dattier par des rejets identiques aux pieds mères contribue à un appauvrissement du pool génétique. La culture de palmiers provenant de croisements dirigés variés reste un moyen d'augmenter la diversité génétique du palmier dattier et d'avoir, ainsi, plus de chance dans la combinaison des traits de la résistance au Bayoud et de la bonne qualité fruitière. L'analyse électrophorétique des jeunes plants de palmier dattier constituant les populations F1 a permis de déterminer les phénotypes électrophorétiques rencontrés chez les descendants. Leurs fréquences ainsi que la comparaison des parents et des descendants sur la base des systèmes enzymatiques EST, ENP et GOT sont données dans les Tableaux I et II. Dans la majorité des cas, les 2 phénotypes les plus fréquents pour une population F1 correspondent à celui du phénotype du cultivar parent. Ainsi, la descendance du cultivar JHL (lot 6) est identifiée par les phénotypes les plus fréquents : E, D et A pour la GOT, EST et ENP, respectivement. Le cultivar parent (JHL) montre les mêmes phénotypes pour chaque enzyme. Près de 80 des comparaisons ont montré une similitude des phénotypes entre le cultivar parent et sa descendance. Des cas d'absence de conformité phénotypique sont obtenus pour certaines enzymes. Ainsi, par exemple, dans le cas des ENP, le croisement du cultivar BSL (phénotype E, hétérozygote) avec le mâle M-2 (phénotype B, homozygote) donne naissance à une descendance dont les phénotypes les plus fréquents sont A (hétérozygote) et D (hétérozygote), tous différents du phénotype parental. Cela peut être expliqué, facilement, par la ségrégation mendélienne des allozymes. En effet, le croisement des génotypes A'B' et C'C' ne peut donner lieu qu'à 2 génotypes A'C' et B'C'. Les autres cas de non-conformité des phénotypes des descendants et du cultivar parent sont retrouvés dans les croisements d'homozygotes différents, n'entraînant la formation que d'hétérozygotes. C'est le cas des croisements IKL X M-2 pour les EST et AGL X M-1 pour la GOT.

Il résulte de cette étude une prédiction des génotypes, voire même des phénotypes des parents connaissant les génotypes des descendants ou inversement. Cela sera d'un grand intérêt dans l'identification des cultivars décimés par le Bayoud. Par ailleurs, la présence d'un génotype dans plusieurs phénotypes, généralement similaires à celui du cultivar (parent femelle), laisse suggérer la présence d'une hérédité maternelle de plusieurs isoenzymes qui ont tendance à coexister avec le génotype de type maternel.

L'association des gènes de la résistance au Bayoud avec les marqueurs à hérédité mendélienne serait de grande importance pour l'étude de la transmission de la résistance à la fusariose du palmier dattier. Ce but ne peut être atteint qu'après identification des gènes de la résistance au Bayoud et la précision de leur situation sur une carte génétique complète.

Tableau I. Fréquences des phénotypes isoenzymatiques (A-K) des estérases (EST), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et endopeptidases (ENP), révélés dans 7 populations F1 de plants de palmier dattier issues de 7 cultivars (lot 1 : IKL ; lot 2 : BSTN ; lot 3 : SLY ; lot 4 : BSL ; lot 5 : BSK ; lot 6 : JHL et lot 7 : AGL) croisés avec 2 mâles, M-2 et M-1 de phénotypes (EST, GOT, ENP) respectifs ; (F, A, B) et (D, E, A).

Enzyme Phénotype ^a		Lots						
		Lot 1 (52)	Lot 2 (54)	Lot 3 (56)	Lot 4 (52)	Lot 5 (53)	Lot 6 (65)	Lot 7 (56)
EST	A	0,30	–	0,02	0,18	0,16	–	–
	B	0,30	0,24	0,29	0,24	0,22	–	–
	C	–	–	–	0,16	0,10	–	0,17
	D	–	–	0,08	0,31	0,12	0,53	0,50
	E	–	–	–	0,07	0,04	0,32	0,23
	F	0,18	–	–	–	0,02	–	–
	G	0,20	0,30	0,36	–	0,06	–	–
	H	0,02	0,28	0,06	–	0,14	–	–
	I	–	–	–	–	–	0,15	0,10
	J	–	–	0,02	0,04	–	–	–
	K	–	0,18	0,17	–	0,14	–	–
GOT	A	0,50	0,36	0,43	0,58	0,46	–	1,00
	B	–	0,22	–	0,17	–	–	–
	C	0,23	0,40	0,24	0,15	0,10	–	–
	D	0,02	0,02	0,02	0,06	–	–	–
	E	0,21	–	0,31	–	0,44	0,85	–
	F	0,04	–	–	–	–	0,15	–
	G	–	–	–	0,02	–	–	–
	H	–	–	–	0,02	–	–	–
ENP	A	–	0,50	0,05	0,64	0,51	0,44	0,25
	B	0,26	0,50	0,36	0,02	0,21	0,37	–
	C	–	–	0,04	0,02	0,28	0,19	0,20
	D	0,74	–	0,55	0,32	–	–	0,21
	E	–	–	–	–	–	–	0,34

^a Voir Figure 1 pour l'identification des différents phénotypes (A-K)

Tableau II. Comparaison des phénotypes isoenzymatiques (A-H) de la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), estérases (EST) et endopeptidases (ENP), révélés au niveau des feuilles de palmiers dattiers mâles (M), femelles (F) et descendants de la population F1 (F1).

Enzyme		Lots						
		1	2	3	4	5	6	7
GOT	M	A	A	A	A	E	E	E
	F	A	C	A	D	A	E	D
	F ₁	(A, C)	(C, A)	(A, E)	(A, B)	(A, E)	(E, F)	(A)
EST	M	F	F	F	F	D	D	D
	F	D	B	B	D	A	D	D
	F ₁	(A, B)	(G, H)	(G, B)	(D, B)	(B, A)	(D, E)	(D, E)
ENP	M	B	B	B	B	A	A	A
	F	D	A	D	E	A	A	E
	F ₁	(D, B)	(A, B)	(D, B)	(A, D)	(A, C)	(A, B)	(E, A)

Remerciements

Ce travail a été financé par la Fondation Internationale pour la Science à Stockholm, Suède (IFS D/1359).

Références

1. Al-Helal AA (1988). Amylase isoenzymes and protein of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Bot Bull Academia Sinica* 29 : 239-244.
2. Baaziz M (1989). The activity and preliminary characterization of peroxidases in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. *New Phytol* 111 : 403-411.
3. Baaziz M, Saaïdi M (1988). Preliminary identification of date palm cultivars by esterase isoenzymes and peroxidase activities. *Can J Bot* 66 : 89-93.
4. Baaziz M, Bendiab K, Brakez Z, Ait Chitt M (1993). Le polymorphisme enzymatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) utilisé comme marqueur de la conformité génétique des vitroplants. In : *Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes*. AUPELF-UREF, Ed John Libbey Eurotext, Paris : 155-158.
5. Bendiab K (1992). Contribution à l'étude de la variabilité enzymatique et protéique chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Apport dans l'amélioration génétique de la plante. Diplôme d'Études Supérieures, Université Cadi Ayyad, Marrakech.
6. Bendiab K, Baaziz M, Brakez Z, Sedra My H (1993). Correlation of isoenzyme polymorphism and Bayoud-disease resistance in date palm cultivars and progeny. *Euphytica* 65 : 23-32.
7. Bennaceur M, Lanaud C, Chevallier M, Bounaga N (1991). Genetic diversity of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) from Algeria revealed by enzyme markers. *Plant Breed* 107 : 56-69.
8. Chandra Sekhar K, De Mason DA (1988). Quantitative ultrastructure and protein composition of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds : a comparative study of endosperm vs. embryo. *Am J Bot* 75 : 323-329.

9. Malencon G (1934). La question du Bayoud au Maroc. *Ann Cryptogam Exot* 7 : 1-41.
10. Saaidi M (1979). Contribution à la lutte contre le Bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse de Doctorat d'Université, Université de Dijon.
11. Stegemann H, Afify AMR, Hussein KRF (1987). Identification of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars by protein patterns. *Phytochemistry* 26 : 149-153.
12. Torres AM, Tisserat B (1980). Leaf isozymes as genetic markers in date palm. *Am J Bot* 67 : 162-167.
13. Toutain G, Louvet J (1974). Lutte contre le Bayoud. IV. Orientation de la lutte au Maroc. *Awamia* 53 : 141-162.

43

Comparaison de la tolérance à la sécheresse chez deux génotypes de maïs marocains. Étude au niveau macroscopique, microscopique et moléculaire

M. CHOKAIRI, H. CHLYAH

*Laboratoire de Physiologie Végétale, Département de Biologie. Université
Mohammed V, BP 1014 Rabat, Maroc.*

La capacité d'évaluer quantitativement les performances des plantes subissant un stress hydrique est très importante au niveau des programmes de recherche qui visent la réhabilitation des régions arides et l'amélioration de la production des plantes cultivées en régions semi-arides.

Les techniques de criblage des variétés qui corrèlent bien avec les réponses obtenues en champs sont nécessaires dans la mesure où elles permettent une importante réduction du temps et des efforts que demanderait une évaluation en champs.

Ces techniques doivent par ailleurs permettre l'évaluation des performances à différents stades de développement de la plante, s'accomplir dans un laps de temps réduit et requérir une faible quantité de matériel végétal.

Dans cette optique, nous proposons un test qui permet d'évaluer indirectement les différences de potentiel osmotique chez deux génotypes de maïs marocains, en déterminant le nombre de protoplastes lysés par passage d'un milieu hypertonique (1,2 MPa) à un milieu hypotonique (0,6 MPa).

La tolérance à la sécheresse est également évaluée par le test de germination dans le mannitol [1, 11, 17, 18], l'élongation des tiges en cas de stress hydrique et la capacité de rétention d'eau par les feuilles excisées [2, 13, 14, 18], qui est considérée comme un caractère héréditaire opérant seulement pendant la période végétative [4-6, 8] et corrélant positivement avec le rendement en champs durant les périodes de sécheresse [7].

L'étude des isoenzymes est réalisée en vue de caractériser les populations étudiées, évaluer leur uniformité structurale et trouver d'éventuelles corrélations avec la tolérance à la sécheresse.

Matériel et méthodes

Les génotypes étudiés proviennent de la station de recherche céréalière de Rabat où ils sont répertoriés sous les noms de Rehamna et Amizmiz 139.

La germination des caryopses est réalisée à l'obscurité et à 25 °C, en présence d'eau distillée ou d'une solution de mannitol (0,72 MPa). Le nombre de semences germées est déterminé au 4^e, 5^e et 6^e jour. L'indice de tolérance à la sécheresse (ITS) est calculé d'après l'équation proposée par Jaradat et Duwayri (1981) :

$$ITS = IV_{\text{mannitol}}/IV_{\text{eau}} \text{ avec } IV = \sum (N_i \times T_i)$$

IV étant l'indice de vigueur défini par Maguire et N_i le nombre de semences ayant germé au jour T_i .

Après germination sur eau distillée, les plantules sont repiquées et placées en serre sous éclairage naturel et arrosées quotidiennement avec de l'eau déminéralisée jusqu'au 27^e jour. L'apport d'eau est alors suspendu pendant 15 jours puis repris au 42^e jour. Les plantes sont récoltées après 48 jours de culture.

Les pertes d'eau par les feuilles excisées sont déterminées à différents niveaux foliaires et âges de la plante. Juste après leur excision, les feuilles sont pesées et placées à l'obscurité, 25 °C et 50 % d'humidité relative. Les variations de la masse de matière fraîche sont évaluées toutes les 30 ou 60 minutes pendant 7 heures.

Les protoplastes sont préparés à partir des feuilles par incubation d'une durée de 3 heures à l'obscurité et 27 °C dans une solution CPW contenant 2 % de cellulase R10, 0,2 % de pectolyase Y23, du mannitol (0,25 M), du NaCl (0,125 M) et du MES (0,5 g/l).

Après 3 rinçages dans la même solution dépourvue d'enzymes, le pourcentage de protoplastes lysés est évalué par l'équation :

$$Z = 100 (X - Y)/X$$

X étant le nombre de protoplastes déterminé par gramme de masse de matière fraîche dans la solution de rinçage (1,2 MPa) et Y le nombre trouvé après dilution de moitié (0,6 MPa).

Les marqueurs enzymatiques étudiés (ADH, GOT, CAT, MDH, 6-PGD, PGM, IDH et β -GLU) sont révélés par électrophorèse sur gel d'amidon suivant les techniques décrites par Cardi *et al.* [3] avec quelques modifications de détail.

Résultats et discussion

Test de germination dans le mannitol

Les résultats obtenus sur la germination (Tableau I) indiquent des différences très significatives entre les deux génotypes étudiés, Amizmiz 139 présentant un indice de tolérance à la sécheresse presque deux fois supérieur à celui de Rehamna.

Tableau I. Variation de l'indice de tolérance à la sécheresse (ITS) chez deux génotypes de maïs marocains.

Génotypes	Rehamna	Amizmiz 139
ITS	0,37	0,63*

* Différence significative à 1 %

Effet du stress hydrique sur l'élongation des tiges

L'accroissement relatif des tiges pendant la période de sécheresse (Tableau II) indique une activation de la croissance chez le génotype Rehamna. La sécheresse n'a cependant pas d'effet sur le génotype Amizmiz 139 dont les plantes stressées présentent le même accroissement que les témoins irrigués.

Après réhydratation, la croissance est stimulée pour les deux génotypes. L'accroissement relatif observé chez Amizmiz 139 est cependant deux fois supérieur à celui de Rehamna, ce qui indique une meilleure capacité d'osmorégulation et donc une plus grande tolérance à la sécheresse.

Tableau II. Effet de la sécheresse sur l'élongation de la tige de deux génotypes de maïs marocains.

Génotypes	Traitement	L ₁ (mm)	L ₂ (mm)	L ₃ (mm)	R ₁	R ₂
Rehamna	Irrigué (I)	116,4	178,4	191,8	53,8	7,5
	Sec (S)	103,2	175,0	195,0	69,6	11,4
	(S/I) x 100	—	—	—	131*	155
Amizmiz 139	Irrigué (I)	152,8	240,2	255,0	57,2	6,2
	Sec (S)	156,6	251,4	312,4	60,5	24,3
	(S/I) x 100	—	—	—	103	381**

** : Différences significatives à 1 %

* : Différences significatives à 5 %

L₁ : Longueur de la tige au 27^e jour (début de sécheresse)

L₂ : Longueur de la tige au 42^e jour (15 jours de sécheresse)

L₃ : Longueur de la tige au 48^e jour (6 jours de réhydratation)

R₁ : Croissance relative entre le 27^e et le 42^e jour

R₂ : Croissance relative entre le 42^e et le 48^e jour

$$R_1 = 100 \times (L_2 - L_1)/L_1$$

$$R_2 = 100 \times (L_3 - L_2)/L_2$$

Rétention d'eau par les feuilles excisées

Les variations des pertes d'eau foliaire en fonction du temps (Figure 1) montrent un début de courbe curviligne qui devient rectiligne 120 minutes après excision foliaire.

Les pertes d'eau, plus importantes pendant la première phase, sont dues au fonctionnement simultané des transpirations stomatique et cuticulaire, mais pendant la

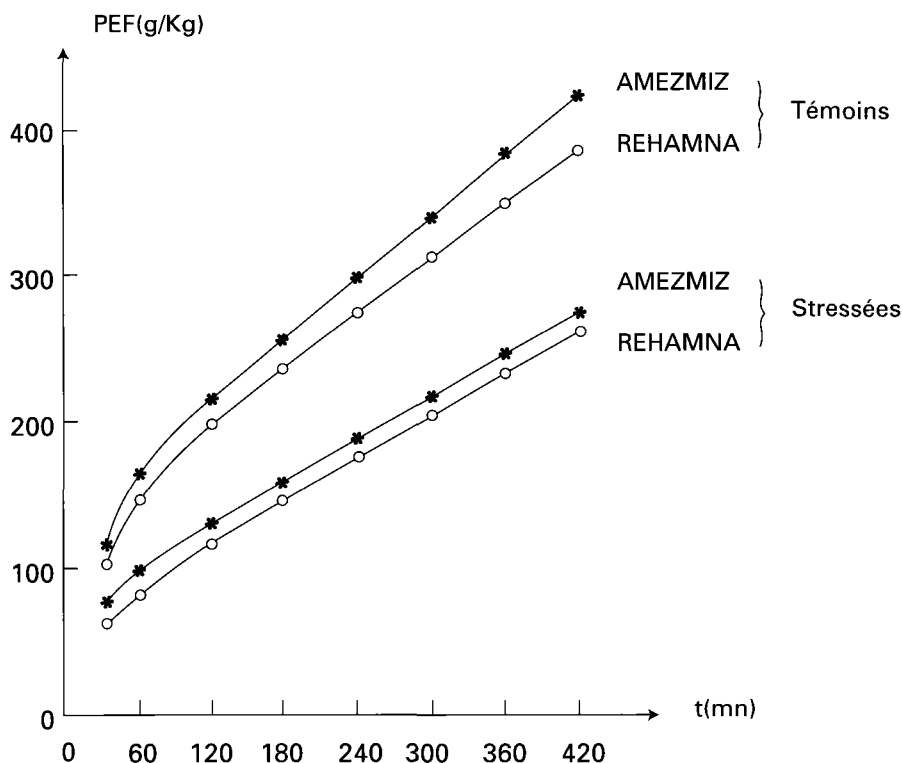


Figure 1. Variations des pertes d'eau par la troisième feuille excisée de deux génotypes de maïs marocains.

deuxième phase, seule subsiste la transpiration cuticulaire puisque les pertes d'eau varient avec une vitesse constante, ce qui indique l'absence de régulation et par conséquent la fermeture des stomates. Les pertes d'eau dépendent dans ce cas de l'épaisseur de la cuticule, dont les variations sont infimes pour les variétés d'une même espèce, et surtout du potentiel osmotique cellulaire qui représente la principale force de rétention hydrique et reflète l'importance des solutés dans les cellules, et partant, la capacité d'osmorégulation pour un génotype donné ainsi que sa tolérance à la sécheresse, qui seront déduites dans le cas présent, non pas des mesures directes des PEF, mais plutôt de leur rapport en présence et en absence du stress (S/T).

Les résultats obtenus (Tableau III) indiquent des différences très significatives entre les deux génotypes pour les trois niveaux foliaires étudiés, la variété Amizmiz 139 étant plus tolérante que la variété Rehamna.

Par ailleurs, on constate une variation des pertes d'eau en fonction de la position foliaire, qui fut signalée également chez le blé [8]. En effet, le rapport S/T est plus faible au niveau de la troisième feuille et augmente progressivement pour les deux niveaux supérieurs. Cela implique donc une concentration plus importante dans les feuilles âgées qui pourraient ainsi constituer une source de solutés pour les jeunes feuilles dans le maintien de leur turgescence par osmorégulation [16].

Durant la première phase curviligne, les variations du rapport S/T reflètent en même temps celles des transpirations stomatique et cuticulaire. Les résultats obtenus une heure après excision de la troisième feuille montrent des différences très significatives entre les deux génotypes (Tableau IV).

Le rapport S/T dans ce cas est plus grand chez Amizmiz 139, contrairement à ce qui est observé pendant la deuxième phase, et implique une perte d'eau foliaire plus importante par les plantes stressées de ce génotype.

Par ailleurs, la transpiration cuticulaire étant plus réduite chez cette variété, S/T étant plus faible par rapport à celui de Rehamna, on peut déduire dans ce cas que sa transpiration stomatique est plus importante, ce qui suppose une ouverture des ostioles et une turgescence des cellules stomatiques plus grandes et donc une augmentation plus marquée de leur potentiel osmotique.

La variété Amizmiz 139, plus tolérante à la sécheresse, serait par conséquent dotée d'un pouvoir d'osmorégulation plus important que celui de la variété Rehamna qui est plus sensible.

Des observations similaires ont été faites chez d'autres cultivars de maïs par Premachandra *et al.* [15], qui ont montré que l'ajustement osmotique chez le maïs mettait en jeu les sucres et le potassium.

Tableau III. Comparaison des pertes d'eau foliaire (PEF) chez deux génotypes de maïs marocains pendant la phase linéaire (deux heures après excision et plus).

Niveau de la feuille	Génotypes	PEF (g/Kg.h)		S/T (%)
		Témoin (T)	Stress (S)	
3	Rehamna	49,0	33,5	68,3
	Amizmiz 139	56,5	33,7	59,7*
7	Rehamna	39,0	39,7	101,9
	Amizmiz 139	46,2	42,2	91,3*
8	Rehamna	35,0	42,0	120,0
	Amizmiz 139	41,2	38,2	92,7*

* Différences significatives à 1 %.

PEF (g/kg) = (MMFI – MMFF)/(MMFI – MMS) [18]

MMFI : Masse de matière fraîche initiale

MMFF : Masse de matière fraîche finale

MMS : Masse de matière sèche

Tableau IV. Variation des pertes d'eau au niveau de la troisième feuille chez deux génotypes de maïs marocains pendant la phase curviligne (une heure après excision).

Génotypes	Rehamna	Amizmiz 139
S/T (%)	60	65*

* Différence significative à 1 %

S/T représente le rapport des pertes d'eau foliaire (en g/Kg.h) en présence et en absence du stress hydrique

Étude au niveau des protoplastes

L'hypothèse retenue dans cette étude suppose l'existence d'un plus grand nombre de cellules à pression osmotique élevée chez la variété tolérante par rapport à la variété sensible. Ainsi, les protoplastes libérés initialement dans un milieu légèrement hypertonique (1,2 MPa), en passant dans un milieu hypotonique (0,6 MPa), vont absorber une quantité d'eau proportionnelle à leur pression osmotique initiale, ce qui entraînera une augmentation de leur volume et à la limite la rupture des membranes plasmiques. Par conséquent, si l'hypothèse de départ est vraie, le pourcentage de protoplastes lysés en passant du milieu hypertonique au milieu hypotonique sera plus important chez la variété tolérante que chez la variété sensible.

Les résultats obtenus sur les plantes de serre (Tableau V) indiquent un taux de lyse des protoplastes plus élevé chez Amizmiz 139 par rapport à Rehamna. Cela implique que la pression osmotique cellulaire initiale est plus importante chez la variété tolérante par rapport à la variété sensible.

Cependant, si pour les plantes de serre on observe des différences très significatives entre les deux génotypes étudiés, en revanche les essais portant sur les plantules étiolées donnent des valeurs pratiquement égales.

Le fait que ces plantules soient privées de lumière et d'éléments nutritifs réduit probablement leur capacité d'ajustement osmotique aussi bien par les sucres que par les éléments minéraux.

Tableau V. Évaluation du % de lyse des protoplastes de deux génotypes de maïs marocains lorsqu'on passe d'un milieu hypertonique (1,2 MPa) à un milieu hypotonique (0,6 MPa).

Matériel végétal	Age des plantes	Génotypes	
	Niveau foliaire	Rehamna	Amizmiz 139
Plantules étiolées	11 jours	53 %	49 %
	F ₁ et F ₂		
	20 jours F ₄	29 %	81 %**
Plantes de serre irriguées	25 jours F ₅	68 %	91 %**
	27 jours F ₂	20 %	29 %*
	42 jours F ₆	9 %	55 %**
Plantes de serre après 15 jours de sécheresse	42 jours F ₆	23 %	65 %**
Moyenne des 5 valeurs obtenues sur les plantes de serre		30 %	64 %*

* : Différence significative à 5 %

** : Différence significative à 1 %

Les réserves initiales de la graine et l'apport des sels pendant les trois heures d'incubation à l'obscurité ne semblent pas suffire pour induire l'expression des différences génétiques au niveau osmotique. La photosynthèse, ou plutôt les pigments photosynthétiques, jouent probablement un rôle important dans la différenciation des génotypes par le biais de leurs synthèses glucidiques, qui contribuent à augmenter de façon plus marquée la pression osmotique chez les génotypes tolérants.

L'absence de lumière et d'éléments nutritifs semble également induire une fragilité des membranes plasmiques, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du pourcentage de lyse des protoplastes pour les plantules étiolées du génotype Rehamna.

Par ailleurs, on constate que sous l'effet de la sécheresse il y a une augmentation des pertes en protoplastes de 14 % chez Rehamna et de 10 % chez Amizmiz 139. Cela implique un accroissement de la pression osmotique qui serait dû non pas à une déshydratation progressive, mais plutôt à l'osmorégulation.

Variabilité enzymatique

Tous les systèmes enzymatiques étudiés sont polymorphes aussi bien chez Rehamna que chez Amizmiz 139, qui présentent le même profil enzymatique dans le cas des ADH, PGD et PGM, les autres loci montrant cependant des différences d'expression alléliques caractéristiques pour chaque génotype.

La fréquence des hétérozygotes varie aussi en fonction des systèmes considérés (Tableau VI).

Tableau VI. Fréquences (en %) des hétérozygotes pour huit systèmes enzymatiques de deux génotypes de maïs marocains.

Locus	ADH	CAT	GLU	GOT	IDH	MDH	PGD	PGM
Rehamna	17	0	0	25	25	96	25	0
Amizmiz 139	25	0	50	0	0	96	50	0

Mis à part le système MDH qui montre une fréquence très élevée en hétérozygotes (96 %) pour les deux génotypes, la variété Amizmiz 139 présente souvent une fréquence de 50 % (β -GLU et PGD) tandis que Rehamna ne dépasse pas les 25 % (GOT, IDH et PGD). Cela semble indiquer une meilleure uniformité structurale des populations de Rehamna par rapport à celles d'Amizmiz 139.

Dans le cas des β -GLU, 50 % des individus de la variété Amizmiz 139 présentent deux bandes supplémentaires par rapport à ceux de la variété Rehamna. Chez ces individus hétérozygotes, qui présentent une interaction intralocus, quatre types d'isoenzymes sont exprimés dans le cytoplasme contrairement aux autres qui n'en montrent que deux. On pourrait donc penser que la multiplicité isoenzymatique permettrait d'augmenter le champ d'action du système enzymatique considéré et entraînerait l'hydrolyse de plusieurs types de β -glucosides en D-glucose, ce qui aurait pour conséquence un meilleur ajustement osmotique, notamment en condition de stress hydrique.

Les catalases présentent également des différences assez nettes entre les deux génotypes. En effet, chez la variété Amizmiz 139, le locus 3 est exprimé seulement par les bandes 7 et 9, tandis que pour la variété Rehamna on trouve en plus une bande inter-

médiaire chez 40 % des individus étudiés, qui résulte probablement de l'interaction entre l'allèle nul et l'allèle 9.

Dans le cas du système GOT, les trois loci sont exprimés chez Rehamna et seul le locus GOT₂ est représenté chez Amizmiz 139.

Chez le génotype Rehamna, il semble que la voie qui aboutit à la formation de l'aspartate par transamination du glutamate soit plus activée que celle qui va dans le sens de la formation de la proline, probablement du fait de l'intervention de plus d'isoenzymes dans le transfert de l'azote aminé du glutamate sur l'oxaloacétate [10].

En revanche, chez le génotype Amizmiz 139, la formation de la proline est probablement plus favorisée, d'où une osmorégulation plus efficace et donc une meilleure tolérance au stress hydrique. Un dosage quantitatif d'enzyme et de proline est cependant nécessaire pour conforter cette hypothèse.

On observe également un polymorphisme plus important des IDH chez le génotype Rehamna et un polymorphisme plus marqué des MDH chez le génotype Amizmiz 139.

Conclusion

Le génotype Amizmiz 139 est plus tolérant à la sécheresse que le génotype Rehamna.

Les résultats obtenus dans l'étude des protoplastes sont discriminants pour ces deux génotypes et corrélaient parfaitement avec le test de germination dans le mannitol, les pertes d'eau par les feuilles excisées et la croissance en présence d'un stress hydrique. La méthode d'étude des protoplastes proposée peut donc servir d'outil efficace et utile dans le criblage pour la tolérance à la sécheresse.

Il serait cependant souhaitable d'utiliser de jeunes plantules, afin de réduire le temps et les efforts que demanderait l'entretien d'une culture de plantes plus âgées, à condition de vérifier que la présence de lumière et d'éléments nutritifs permet le maintien des différences observées chez les plantes adultes.

Au niveau moléculaire, les huit enzymes étudiées présentent des profils caractéristiques pour chaque génotype. L'importance du polymorphisme enzymatique observé permet de bien apprécier l'uniformité structurale des populations étudiées. Des corrélations avec la tolérance à la sécheresse semblent très probables par le biais du fonctionnement physiologique de la plante. Ces corrélations demandent cependant à être confortées par des dosages quantitatifs d'enzymes et d'acides aminés libres, ainsi que par des programmes de croisement intra-spécifique jusqu'à la génération F2.

Références

1. Ashraf CM, Abu-Shakra S (1978). Wheat seed germination under low temperature and moisture stress. *Agron J* 70 : 135-139.
2. Bayles BB, Taylor JW, Bartel AT (1937). Rate of water loss in wheat varieties and resistance to artificial drought. *J Am Soc Agron* 29 : 40-52.
3. Cardy BJ, Stuber CW, Goodman MM (1980). Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize. Institute of Statistics Mimeo Series N° 1317 Revised. North Carolina State University, Raleigh, NC, 31 p.
4. Clarke JM (1987). Use of physiological and morphological traits in breeding programmes to improve drought resistance of cereals. In : *Drought tolerance in winter cereals*.

- Srivastava JP, Porceddu E, Acevedo E, Varma S, eds. Proceedings of an international workshop 1985, Italy. J Wiley et Sons Ltd : 171-189.
5. Clarke JM, Mc Caig TN (1982). Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Sci* 22 : 503-506.
6. Clarke JM, Mc Caig TN (1982). Excised-leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. *Can J Plant Sci* 62 : 571-578.
7. Clarke JM, Townley-Smith TF (1986). Heritability and relationship to yield of excised-leaf water retention in durum wheat. *Crop Sci* 26 : 289-292.
8. Dedio W (1975). Water relations in wheat leaves as screening tests for drought resistance. *Can J Plant Sci* 55 : 369-378.
9. Frearson EM, Power JB, Cocking EC (1973). The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev Biol* 33 : 130-137.
10. Givan CV (1980). Aminotransferases in higher plants. In : Stumpf PK, Conn EE, eds. *The biochemistry of plants*. Vol. V. Academic Press, New York : 329-358.
11. Jaradat A, Duwayri M (1981). Effect of different moisture deficits on durum wheat seed germination and seedling growth. *Cereal Res Comm* 11 : 179-186.
12. Maguire JD (1962). Speed of germination. Aid in selection and evaluation for seedling emergence vigour. *Crop Sci* 2 : 176-177.
13. Mc Caig TN (1986). A microcomputer-controlled leaf-weighing system. *Agron J* 78 : 551-557.
14. Mc Caig TN, Romagosa I (1989). Measurement and use of excised-leaf water status in wheat. *Crop Sci* 29 : 1140-1145.
15. Premachandra GS, Saneoka H, Kanaya M, Ogata S (1989). Responses of relative growth rate, water relations and solute accumulation to increasing water deficits in maize. *J Plant Physiol* 135 : 257-260.
16. Sharp RE, Osonubi O, Wood WA, Davies WJ (1979). A simple instrument for measuring leaf extension in grasses and its application in the study of the effects of water stress on maize and *Sorghum*. *Ann Bot* 44 : 35-45.
17. Williams TV, Snel RS, Ellis JF (1967). Methods of measuring drought tolerance in corn. *Crop Sci* 7 : 179-182.
18. Winter SR, Musick JT, Porter KB (1988). Evaluation of screening techniques for breeding drought-resistant winter wheat. *Crop Sci* 28 : 512-516.

44

Utilisation des marqueurs RFLP pour l'évaluation des niveaux d'hétérozygotie chez *Medicago sativa*

C. SCOTTI, F. PUPILLI, S. BUSINELLI,
F. DAMIANI, S. ARCIONI, P. ROTILI

ISCF, Lodi, Italie.

IMGPF (CNR). Perugia, Italie.

L'objectif du programme de recherche sur luzerne (*Medicago sativa*), espèce autotétraploïde, mis en route chez l'ISCF de Lodi est d'arriver à savoir s'il est possible d'utiliser les marqueurs RFLP pour estimer l'hétérozygotie des plantes. Le but final des différentes méthodes d'amélioration génétique est de cumuler la vigueur liée à l'état hétérozygote avec celle liée à la qualité des gènes et linkats. Une phase d'autofécondation, en réduisant l'hétérozygotie, augmente l'efficacité de la sélection des gènes et linkats favorables à la vigueur (production de phytomasse). Les RFLP pourraient améliorer le rendement du procédé de création variétale en accélérant le choix des individus pendant la phase d'autofécondation, et en maximisant la diversité génétique des plantes constituant le nouveau cultivar.

Le programme général de recherche prévoit l'analyse de 9 plantes SO et des familles S1 correspondantes (15 individus/famille). L'ADN total est hydrolysé par 4 enzymes de restriction et hybridé avec 45 (SO) et 19 (S1) sondes issues d'une librairie génomique de *M. sativa*. Les niveaux d'hétérozygotie sont estimés par le nombre moyen de bandes dans les loci RFLP (combinaisons sonde-enzyme) considérés (60-90 en SO ; 19-25 en S1).

L'effet de l'autofécondation est estimé par la diminution du nombre de bandes par rapport à la plante mère et par la réduction de la vigueur par rapport aux familles polycross.

Au niveau SO, les 9 individus présentent un nombre moyen de bandes compris entre 4,8-3,67 ; cet écart des valeurs extrêmes est significativement différent. On retrouve fréquemment des valeurs supérieures à 4, maximum d'hétérozygotie/locus, ce qui indique soit la présence de loci dupliqués, soit la subdivision d'un même locus RFLP. La diminution du niveau d'hétérozygotie en S1 détectée par les marqueurs RFLP varie entre - 1,7 et - 9,56 dans les différentes familles (valeur attendue sous l'hypothèse d'une fréquence égale des 5 structures génotypiques possibles en SO = - 11.5). La plus faible diminution est donnée par la plante mère dont le niveau d'hétérozygotie est le plus bas. La réduction du nombre de bandes n'est pas homogène dans les différents loci RFLP. On n'a pas trouvé de corrélations significatives entre niveaux d'hétérozygotie et vigueur dans les générations SO et S1.