

# Evaluation et utilisation des ressources génétiques des mils et des sorghos. Collecte et valorisation des formes sauvages

Marboua BENINGA \*

*Résumé* : Ce travail souligne l'importance des variabilités des formes traditionnelles des mils et sorghos au niveau africain et fait la synthèse des données bibliographiques en matière de collecte et conservation de ces formes. Les évaluations génétiques et les utilisations en amélioration des plantes sont ensuite traitées avec un accent particulier sur le cas de la Côte d'Ivoire. L'aspect utilisation industrielle de ces céréales est dégagé pour mieux illustrer ce que les formes spontanées peuvent apporter aux cultivées.

*Mots-clés* : *Pennisetum*, *Sorghum*, ressources génétiques, prospection, évaluation, utilisation, résistances.

*Abstract* : In this paper, we put emphasis on the high level of genetic diversity within **landraces** of pearl millet and sorghum in Africa. Data pertaining to the collection and evaluation of this **germplasm** are also discussed. As for the use of this variability in breeding schemes, we discuss the case of Ivory Coast research program. In addition, the potential use of genes from wild relatives, belonging to the primary gene pool is documented.

## Introduction

Les mils et les sorghos, céréales d'origine africaine, se cultivent dans les zones les plus diverses de ce continent : oasis, oueds, vallées de fleuves, zones submergées, plateaux, etc. Cette diversité de sites confère une importante variabilité génétique observée sur ces céréales. En parcourant l'Afrique d'Est en Ouest et du Nord au Sud, l'importance des variabilités de mils et sorghos se traduit ça et là par une multiplicité de noms locaux. Ces variabilités portent sur la forme des épis, la couleur ou la grosseur des grains, le cycle végétatif et l'utilisation que l'on fait des grains.

\* Station de Recherche Agronomique, IDESSA Base nord, BP 121 Ferkessédougou, Côte d'Ivoire.

Dans la première partie de ce travail, place est faite à la synthèse des travaux montrant l'existence des différentes formes de mils, sorghos cultivés et des formes spontanées. La deuxième partie traite du volet **prospection-collection-conservation** avant de céder le pas aux utilisations en amélioration des plantes. La dernière partie aborde l'utilisation industrielle de ces céréales en mettant un accent particulier sur les réserves des gènes favorables que constituent les formes spontanées ou sauvages.

### **Variabilité des mils et des sorghos : synthèse des données bibliographiques**

Dans son article intitulé : « Au Tchad les transformations subies par l'agriculture traditionnelle sous l'influence de la culture cotonnière », Gaide (1956) a donné des indications très intéressantes sur la large gamme des mils et sorghos cultivés dans le sud du Tchad. L'auteur distingue deux groupes :

a) Le groupe des petits mils (*Pennisetum typhoideum*) avec deux variétés, une tardive et une précoce.

b) Le groupe de gros mils (sorghos) non repiqués. Ce sont des gros mils rouges et blancs. Les rouges (surtout *Sorghum caudatum*) sont en général plus précoces que les blancs. Semés en avril, ils sont récoltés fin juillet-août. Les mils blancs sont dans l'ensemble plus tardifs que les précédents. Semés en mai-juin, ils sont récoltés en novembre ou décembre. Ces mils blancs se rattachent soit au *Sorghum caudatum* à panicule compacte, soit au *Sorghum notabile* à panicule plus lâche.

c) Le groupe des mils repiqués subdivisés en deux sous-groupes : le sous-groupe des repiqués précoces (repiqués vers mi-juillet) et le sous-groupe des repiqués tardifs (repiqués vers fin septembre et en octobre après le retrait des eaux). Dans « Mils et sorghos cultivés dans le Niger-Est », Dumont (1966) a précisé la nature et les caractéristiques des variétés locales cultivées et leur aire d'expansion au Niger. Pour les mils, l'inventaire des variétés cultivées a été précédé d'une revue des caractères **variétaux** qui sont : la forme de l'épi, la longueur de -l'épi, la couleur du grain, la couleur des involucre, l'**aristation** de l'épi et d'autres caractères secondaires comme la grosseur des grains, le nombre de fleurs fertiles et de grains par épillet. Bien que le caractère **allogame** du mil rende difficile la fixation des caractéristiques **variétales**, l'auteur a distingué deux types de mil, les mils hâtifs et les mils tardifs.

Les mils hâtifs sont de deux sortes : les mils hâtifs courts au nombre de six (Tamangagi, Ba Angouré, Ankoutess, Batoukouché, Dan Tchama, Boudouma), et les mils hâtifs longs au nombre de trois (Zongo, Tamatagna, Dan Zagaro). Les mils tardifs sont constitués par le Maiwa dont le cycle atteint et dépasse 120 à 130 jours.

Pour les sorghos, les caractères **variétaux** les plus importants sont la couleur du grain, la **vitrosité** du grain, les dimensions du grain, la taille et

la couleur des **glumelles**, la forme de la panicule, la hauteur de la tige. L'observation des caractères **variétaux** a permis à l'auteur de distinguer les variétés cultivées suivantes :

—Les sorghos à grain volumineux, farineux, panicule compacte, généralement crossée comprenant les types hâtifs (**Tagazanni**) et tardifs (**Babadia fara**, **Babadia Ja**, **Roukoutou**, **Tankorei**, **Babandia** « nain », **Koutchin Zonro**).

—Les sorghos à grains moyens, blancs, semi-vitreux, à panicule dressée, tardifs, comprenant le **Farfara**, le **Feroni**, le **Guizan Baro**, l'**El Majwajé**.

—Les sorghos à grains moyens, jaunes, vitreux, à panicule longue et dense, comprenant les hâtifs (**Massaba**) et les tardifs (**Kaouara**).

—Les sorghos à grain moyen farineux, à panicule lâche dressée ou crossée, comprenant les hâtifs (**El Baba**, **Lala**, **Guizan Bourtou**, **Ngabiri Dongoya**) et les tardifs (**El Bazanga**, **Soto**, **Mangaram**, **Boutiri fouta**, **Bia Guero**).

—Les sorghos à grain petit, vitreux, à panicule courte et dense, comprenant les hâtifs (**Doukouss**, **Kahi chibra**) et les tardifs (**Jaour**, **Bagassaye**, **Komboula**, **El Birni**).

—Les sorghos divers (sorgho sucré, sorgho à farine rouge, sorgho vêtu, sorgho à panicule très lâche, grain petit, vitreux).

De leur côté, Sapin et Reynard (1968) notent les nombreuses variétés cultivées de sorgho de décrue du Sénégal d'appellations vernaculaires très diverses et dont l'ensemble appartient cependant à quatre grands types bien caractérisés : les samba **souki**, les **pourdi**, les **sevil** et les **diakhnate**. Barrault *et al.* (1972) distinguent deux grands groupes de sorghos repiqués du nord Cameroun : les **Muskwari** et les **Babouri**.

Les **Babouris** sont des sorghos très homogènes et qui comprennent les variétés :

—**Wale-Mansan** à panicule demi-lâche à lâche, ovoïde avec un pédoncule droit. Le grain farineux est blanc mat avec une couche brune et donne par conséquent une farine colorée.

—**Madessé** à grain complètement rouge, surtout utilisé pour la fabrication de la bière.

Les **Muskwari** (appelés **Berbérés** au Tchad) comprennent sept types principaux. Ces types principaux recouvrent eux-mêmes une multitude de variétés.

—Le **Safari** est un **Muskwari** à grain jaune donnant une farine blanche.

—Le **Madjéj** est un **Muskwari** à grain blanc, à boule et farine blanches.

—Le **Bourgouri** est un **Muskwari** à grain blanc crème donnant une farine blanche.

—Le **Soukatari** a un grain rouge vif mais donne une farine et une boule blanches.

—Le **Mandouwéiri** a un grain marron très clair donnant une boule blanche.

—Le **Soulkéiri** porte des grains blancs et rouges, est peu apprécié des cultivateurs et ne fait pratiquement l'objet d'aucune culture.

Plus récemment, **Appa Rao** et **Mushonga** (1987) ont décrit les races de mils et de sorghos cultivées au **Zimbabwe**. Pour le sorgho il s'agit des races **Kafir**, **Caudatum**, **Guinea**, **Durra**, **Bicolor** et les hybrides entre **Kafir**, **Caudatum** et **Guinea**. Les deux espèces sauvages (*Sorghum halepense*, *Sorghum verticilliflorum*) ont été également citées comme poussant dans ce pays. Pour

le mil, d'importantes variations **intra-échantillons** ont été notées pour les caractères hauteur de la plante, maturité, forme de l'épi, la taille et la présence ou l'absence des soies. Bien que le *Pennisetum violaceum* (forme sauvage) n'ait pas été rencontré au Zimbabwe, il existe de nombreuses formes intermédiaires (semblables à la sous-espèce *stenostachyum*) dans les champs aux côtés des formes cultivées. Ces formes intermédiaires sont des hybrides naturels de cultivées et sauvages.

Cette rapide revue bibliographique bien que limitée à seulement quelques pays montre la grande diversité des mils et sorghos tant du point de vue des formes cultivées que sauvages. Il est un autre constat, c'est la disparition progressive de cette richesse génétique végétale. Qu'est-ce qui a été fait pour sa conservation, c'est l'objet du chapitre suivant.

### Prospections, collections, conservation

La conjonction de nombreux facteurs contribue depuis les années 1950 à l'appauvrissement voire à la disparition de nombreuses variétés de mils et sorghos. Parmi ces facteurs citons :

- L'introduction des cultures de rente dont l'encadrement et la promotion laissent pour compte les cultures vivrières.
- Le changement des habitudes alimentaires.
- Les sécheresses successives.
- L'urbanisation des campagnes.

Face à ces facteurs adverses, de nombreuses voix dont celles des gouvernements, de la FAO, de l'**IBPGR** et des organismes comme la Fondation Rockefeller se sont élevées en vue de la collecte et de la sauvegarde de ce qui peut encore l'être. Depuis, de nombreuses missions se sont succédées en vue de collecter les ressources génétiques de mils et sorghos. Ces ressources sont disponibles pour certaines au centre **ICRISAT** (Inde), à l'**ORSTOM** (France), à Fort Collins (USA), ou avec plus ou moins de bonheur dans les pays de prospection. L'annexe I fait l'état des ressources génétiques collectées de mils et sorghos au niveau africain.

Les données de l'annexe I bien que fragmentaires montrent l'existence de collections de mils et sorghos. Les collections appelées à s'effectuer dans les pays non prospectés et à s'accroître encore sont entretenues activement dans certains centres ou stockées sous forme de semences dans des magasins spéciaux.

Au niveau de grandes institutions de recherche comme l'**ICRISAT** ou l'**ORSTOM**, les ressources génétiques collectées sont évaluées et utilisées en amélioration des plantes. Cela n'est pas encore de règle dans la plupart des pays africains. Certains pays d'Afrique de l'Ouest comme la Côte d'Ivoire ont, comme nous le verrons dans le chapitre qui suit, emboîté le pas aux grandes institutions et utilisent après évaluation les ressources génétiques en amélioration des plantes.

## Evaluation et utilisation des ressources génétiques des mils et sorghos en amélioration des plantes : cas de la Côte d'Ivoire

L'évaluation minutieuse des ressources génétiques de mils et sorghos pour les caractères morpho-agronomiques, la résistance aux insectes, aux maladies, au striga et à la sécheresse constitue la première étape dans l'exploitation de la variabilité. La sensibilité à la photopériode de la plupart des mils et sorghos impose d'évaluer les collections dans leurs aires d'origine.

Évaluer un matériel là où il n'est pas adapté peut conduire inmanquablement à la perte de la collection ou en changer l'expression. Citons pour mémoire le cas des sorghos des hauts plateaux éthiopiens. Introduits en Inde et maintenus 15 ans durant dans les plaines de New Delhi et d'Hydrabad, ces sorghos (1 073 entrées au total) se sont montrés très précoces et de taille plus réduite dès qu'ils ont été ramenés dans leur aire d'origine en Éthiopie. En Côte d'Ivoire, toutes les formes cultivées traditionnellement de mil et de sorgho ont été collectées et évaluées, certaines sont utilisées en amélioration variétale comme le montre ce qui suit.

### Evaluation et utilisation des cultivars de mils

L'évaluation des 72 échantillons de mil prospectés en 1979 a permis à Brac de la Perrière (1982) de distinguer quatre pools d'égale importance regroupant les cultivars d'une même région.

Pool A : Région **Lobi-Koulango**. Caractéristiques de production peu valorisées, petites chandelles, tallage moyen, tardifs.

Pool B : Région **Ferkessedougou-Korhogo**. Cultivars tardifs, faible tallage, chandelles longues.

Pool C : Région **Boundiali**. Cultivars précoces, chandelles longues, faible tallage.

Pool D : Région **Malinké-Tingrela**. Cultivars précoces, fort tallage, chandelles moyennes.

Les mils de Côte d'Ivoire (Beninga, 1989) sont de taille élevée (2 à 4 m), avec des chandelles moyennes (17 à 40 cm de long), peu larges (20 à 36 mm) et à grains gris-bleuté à gris jaune. Leur cycle végétatif est long (125-145 jours). Ils sont sensibles à la photopériode et peu productifs (rendement en milieu paysan de l'ordre de 5 quintaux à l'hectare).

L'étude de quelques paramètres génétiques de ces mils a montré qu'il est nécessaire d'utiliser des schémas de sélection basés sur les méthodes d'amélioration inter-population (sélection récurrente et sélection récurrente réciproque) pour améliorer régulièrement leur potentiel de production. Ces schémas sont susceptibles d'exploiter les effets géniques de type dominance et additivité (cas de la sélection récurrente réciproque). Celle-ci augmente non seulement la fréquence des gènes favorables mais maintient également les combinaisons géniques intéressantes et la variabilité génétique. Par la sélection massale, il est possible d'améliorer rapidement les caractères fortement héréditaires qui sont liés entre eux, comme la date d'épiaison de la talle principale, la largeur de la feuille paniculaire, la longueur, la largeur et le poids de la chandelle principale.

Sur la base de ces différents résultats, nous avons constitué pour le Nord-Est, le Centre-Nord et le Nord-Ouest respectivement, un bulk des meilleurs écotypes. Ces trois bulks ont été soumis d'année en année depuis 1983 à une pression douce de sélection **massale**. Les premiers tests de rendement réalisés en 1987 ont indiqué pour les différentes variétés, appelées par les initiales de leurs origines, les rendements suivants :

NE : 17 q/ha

CN : 23 q/ha

NW : 20 q/ha

Dans le même temps, les mils du Nord-Est et ceux du Nord-Ouest qui se distinguent bien par leurs cycles et leurs caractéristiques de production ont été confrontés réciproquement par le jeu de la sélection récurrente réciproque. Les premiers tests de rendement ont aussi donné des résultats particulièrement encourageants (22 q/ha pour la population source Nord-Ouest et 24 q/ha pour la population source Nord-Est). L'ensemble de ces travaux est décrit en annexe **II**.

Le souci constant de la conservation des ressources génétiques des mils ivoiriens pour les différents besoins nous a conduit à réaliser en 1989 et en 1990 une nouvelle prospection dix ans jour pour jour après la première. Pendant l'hivernage 1990, l'ensemble du matériel collecté a été semé et évalué à **Ferkessédougou**. Les observations ont porté sur les caractères : vigueur précoce, hauteur à un mois, épiaison de la talle principale, longueur et largeur du drapeau, nombre de talles basales et talles utiles, sensibilité au mildiou et au charbon, hauteur à maturité, longueur et largeur de la chandelle, poids de 1 000 grains.

Les données sur l'épiaison de la talle principale, la hauteur de la plante à maturité et la longueur de la chandelle (prospection 1989) et le poids de 1 000 grains (prospection 1990) sont indiquées en annexe **III**. La précocité des mils du Nord-Ouest et leur taille plus petite par rapport aux mils du Nord-Est apparaissent clairement dans cette annexe où ne sont transcrites que les entrées identifiées pour servir de parents dans le programme d'amélioration.

Un travail similaire est fait sur le sorgho. En voici les grands aspects.

## Evaluation et utilisation des cultivars de sorghos

Lors de la prospection **mil-sorgho-fonio** de 1979, 197 écotypes de sorgho ont été collectés et leur évaluation a permis de distinguer 3 espèces de sorgho selon la classification de Viguiet.

— *Sorghum margaritifera* appelé « **Kendé** » par la population Malinké. Cette espèce se rencontre dans le Nord-Ouest du pays et se caractérise par de petits grains très vitreux et très durs.

— *Sorghum gambicum* à cheval entre le Nord-Ouest et le Nord-Est avec une prédominance dans le Centre-Nord dans la région de **Ferké-Korbogo**. Cette espèce se caractérise également par de petits grains vitreux.

— *Sorghum guineense* encore appelé « **Bimbiri** » par la population Lobi du Nord-Est où cette espèce se rencontre. Elle se caractérise par de gros grains farineux.

L'étude de ces écotypes de sorgho ivoirien fait apparaître aussi qu'ils sont de grande taille (3 à 5 m de hauteur), photosensibles, peu productifs mais présentant une bonne adaptabilité à leurs zones de culture. Les travaux d'amélioration **variétale** de ces sorghos ont porté sur deux volets (Annexes VI et V).

— Constitution et sélection des bulks F1.

— Exploitation directe de la collection.

Les critères de sélection ont été définis relativement au rendement, à l'adaptabilité et à la qualité des grains. Brièvement, nous avons résumé les travaux qui se font sur les mils et sorghos en Côte d'Ivoire suite aux différentes évaluations réalisées localement. Avant d'aborder le dernier chapitre (collecte et valorisation des formes sauvages), nous allons rapidement dire quelques mots des différentes **utilisations** des mils et sorghos.

### Utilisation des mils et sorghos en alimentation

L'intérêt évident des mils et sorghos vient du fait qu'ils servent à l'alimentation humaine et constituent pour la plupart des paysans africains et indiens qui les cultivent la nourriture de base. Les nombreuses préparations traditionnelles (couscous, bouillies, galettes, beignets, bière, etc.) se maintiennent en bonne place un peu partout à en juger par la diversité des noms locaux. Ainsi, la boule de mil est appelée **tô** en Afrique de l'Ouest, **Sankati** en Inde, **mosokwane** au Botswana, **nsima** au Malawi, **ugai** au Kenya et en Tanzanie et j'en passe.

Ces derniers temps, on parle de plus en plus de l'utilisation industrielle du sorgho **et/ou** du mil. Au **Nigéria** notamment, l'utilisation industrielle du sorgho va croissante. On trouve couramment sur le marché nigérian le sorgho sous forme d'éclats, de biscuits et gaufrettes. Dans des pains à base de farines composées, le sorgho est reconnu meilleur remplaçant du blé. A la suite de l'interdiction d'importer du malt d'orge en 1988 par le gouvernement nigérian, l'industrie de la brasserie de ce pays a utilisé du sorgho comme matière première pour la production de bière blonde en association avec le maïs. L'aliment de sevrage traditionnel le plus populaire au **Nigéria** et appelé **Ogi** est préparé à base de sorgho, de maïs fermenté, de mil ou de riz. Les brasseurs qui font de la bière au **Nigéria** se servent beaucoup à l'heure actuelle du sorgho.

Tous ces produits alimentaires nécessitent pour leurs fabrications des variétés d'un type particulier. Ces types particuliers, où les trouver ? Certainement pas dans la plupart des variétés cultivées de mil et sorgho que nous connaissons. Il faut regarder ailleurs et surtout du côté des formes sauvages de ces céréales. Ces formes sauvages très peu connues recèlent probablement des gènes pour tel ou tel usage. Aussi, c'est donc à juste titre que nous voulons terminer notre propos par la collecte et la valorisation des formes sauvages.

### Collecte et valorisation des formes sauvages

Dans son article sur la génétique de la domestication des céréales, feu le Professeur Jean **Pernès** (1983) a écrit ceci au sujet des populations sauvages spontanées : «celles-ci ont été confrontées depuis les temps géologiques à la diversité des adversités biologiques et physiologiques et ont accumulé une

« mémoire génétique adaptative » considérable. La sélection faite par les paysans des centres d'origine s'est réalisée, fait remarquable, sans appauvrissement inutile de la variabilité génétique grâce à ces flux de gènes entretenus à partir de ces immenses réservoirs naturels spontanés. Ceux-ci sont hélas en cours de disparition, du fait des remaniements importants imposés par l'agronomie moderne. Cette protection des formes sauvages et de leur connexion avec les formes cultivées est à décider de façon urgente ». Répondant à lui même, le Professeur Pernès était allé au-delà de cet appel. En effet, sous sa discrète mais **efficace** direction, de nombreux élèves ont travaillé dans ce qui fut le laboratoire GPDG de Gif sur Yvette pour aider à mieux comprendre le mécanisme de relations sauvages/cultivés du mil en vue d'une exploitation rationnelle des formes spontanées de cette céréale.

Les nombreux travaux de l'école Jean Pernès ont montré que le nombre de gènes déterminant le syndrome de domestication pour les caractéristiques de l'épi (caducité, enveloppement des grains...) est faible, de l'ordre de 4 à 6. Ces gènes sont regroupés sur un même segment chromosomique (Beniga, 1981 ; Niangado, 1981 ; **Rey-Herme**, 1982 ; Pernès, 1982 et 1983 ; Joly — **Ichenhauer**, 1984). Cette situation se traduit par une facilité de récupération des descendances de type cultivé à partir d'hybrides (sauvage x cultivé). On voit qu'il est possible d'envisager d'utiliser le polymorphisme des formes sauvages dans son ensemble pour l'acquisition de propriétés adaptatives assez générales.

Aujourd'hui, de nombreuses collections d'espèces sauvages de mil et sorgho existent mais sont très peu valorisées. Tout au plus elles sont simplement maintenues, ce qui pose à terme le problème de leur utilité devant un environnement qui lui, ne cesse de changer. Le Centre ICRISAT de l'Inde dispose de 157 échantillons d'espèces sauvages de sorgho maintenus simplement en collection. De son côté, l'ORSTOM dispose également de nombreux échantillons de mils spontanés collectés au Burkina-Faso et au Niger. Tostain (1991) a montré que les mils sauvages ont une large diversité génétique structurée en cinq groupes correspondant aux aires géographiques. Cela suppose qu'il faut collecter et maintenir les populations de différents sites séparément puis suivre également leur évolution avec le temps. Hanna (1987) montre que dans le pool génique primaire se trouvent les sous-espèces sauvages et adventices, à savoir *monodii* et *stenostachyum* qui permettent facilement l'amélioration du mil. Il est plus **difficile** par contre de manipuler et de transférer le matériel génétique à partir des pools secondaires (*Pennisetum purpureum*  $2n = 4x = 28$ ) et tertiaires (*P. orientale* et *P. villosum*).

Ces caractéristiques intéressantes chez les espèces sauvages sont : la résistance aux maladies et aux insectes ravageurs, les gènes permettant de restaurer la fertilité du cytoplasme Al, la diversité cytoplasmique, les gènes associés au rendement, l'apomixie, le cycle et les caractéristiques liées à l'inflorescence et à la morphologie de la plante. La **recherche** sur les espèces sauvages demande une définition précise des objectifs, de grandes populations végétales, des méthodes efficaces de criblage et un travail en équipe.

Les méthodes modernes basées sur la technologie moléculaire permettront-elles de surmonter ces obstacles et exploiter cette immense richesse des formes sauvages pour la mise au point de variétés à large spectre d'adaptation et de goût ? C'est notre vœu le plus ardent.

## Conclusion

Ce travail nous a rappelé l'importance des mils et sorghos en alimentation humaine et les problèmes de la disparition rapide de certaines variétés. Les immenses ressources génétiques cultivées et sauvages sont encore disponibles. Si la communauté scientifique internationale accorde à ces céréales toute l'attention désirée, leur exploitation en amélioration des plantes serait possible.

## Bibliographie

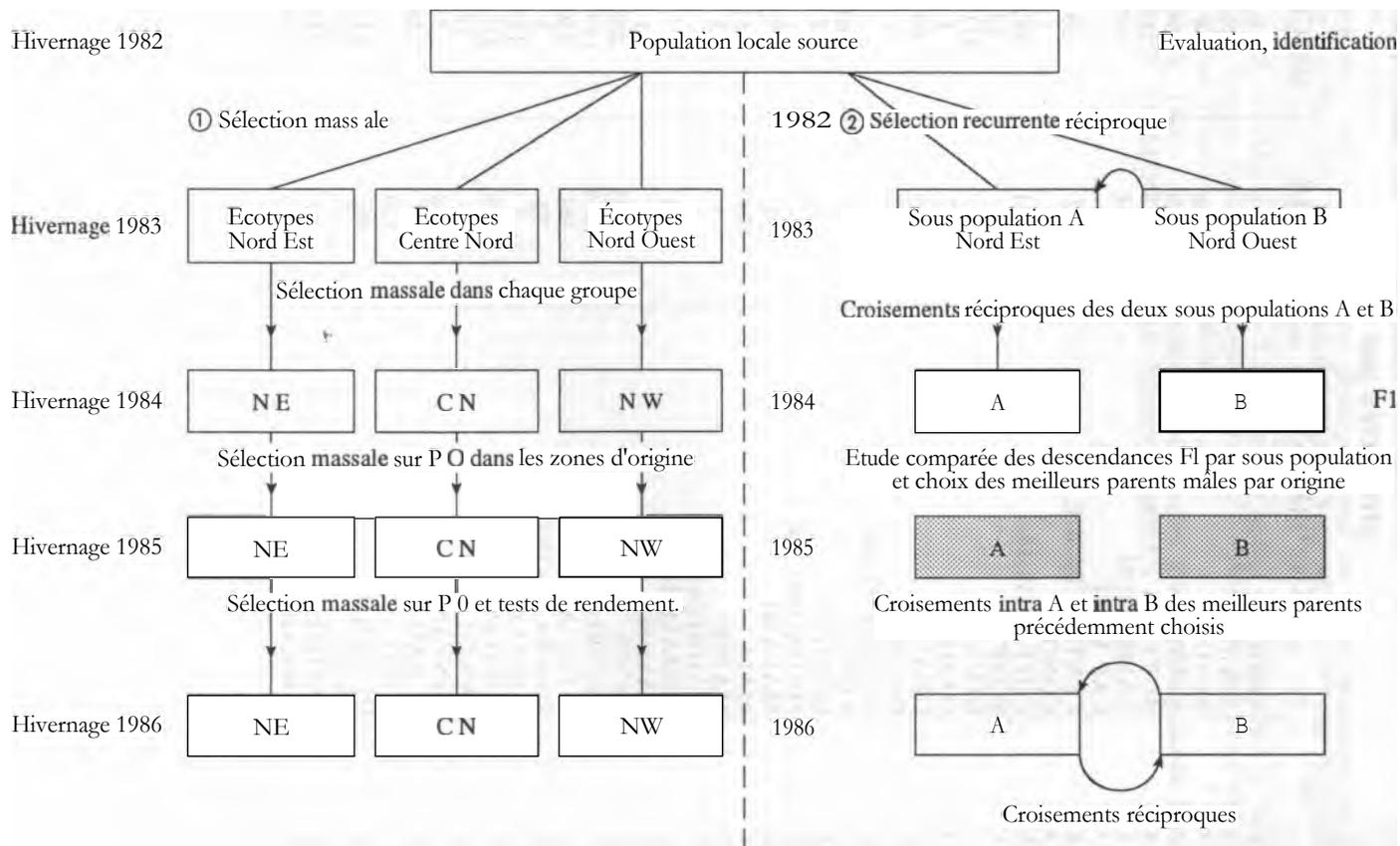
- ANAND KUMAR K. et APPA RAO S., 1987 — Diversity and Utilization of Pearl Millet Germplasm. *Proceedings International Pearl Millet Workshop*, 7-11 April 1986, ICRISAT Center, India.
- ASSAIMOI A.F., 1987 — *Amélioration variétale du sorgho*. Réunion AISA : Section Amélioration des Plantes IDESSA, Dép. des Cultures Vivrières.
- BARRAULT J., ECKEBIL J.P., VAILLE J., 1972 — Point des travaux de l'IRAT sur les sorghos repiqués du Nord-Cameroun. *L'Agronomie Tropicale*, vol XXVII, n° 8.
- BENINGA M.B., 1989 — Programme amélioration des variétés et techniques de production du mil (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.). Rapport de campagne 1988 IDESSA, Dép. des Cultures Vivrières.
- BENINGA M.B., 1989 — Etude de quelques paramètres génétiques des cultivars de mil (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) de Côte d'Ivoire et stratégies de sélection. *Proceedings of Regional Pearl Millet Improvement Workshop*, ICRISAT Sahelian Center, Sadoré Niger, 4-7 septembre 1989.
- BENINGA M.B., 1988 — Programme d'amélioration variétale du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb.). Rapport de campagne 1987 IDESSA, Département des Cultures Vivrières.
- BENINGA M.B., 1981 — *Structure génétique du complexe des mils pénicillaires : Analyse des descendances issues d'hybrides entre formes cultivées et formes spontanées*. Thèse doctorat 3<sup>e</sup> cycle, spécialité Amélioration des plantes. Paris XI, Orsay, 82 p.
- BRAC DE LA PERRIERE, 1982 — Contribution à l'évaluation, la conservation et le développement du mil (*P. typhoides* Brum Stapf et Hubb) de Côte d'Ivoire. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, spécialité Amélioration des Plantes, Paris XI, Orsay, 111 p.
- DUMONT S., 1966 — Mils et sorghos cultivés dans le Niger-Est, *Agronomie Tropicale*, vol XXI, n° 8.
- GAIDE M., 1956 — Au Tchad, les transformations subies par l'agriculture traditionnelle sous l'influence de la culture du coton.
- HANNA W.W., 1987 — Utilization of Wild Relatives of Pearl Millet. *Proceedings International Pearl Millet Workshop*, 7-11 April 1986, ICRISAT Center, India.
- JOLY-ICHENHAUSER H., 1984 — Hérité du syndrome de domestication chez le mil *Pennisetum typhoides* (Burm.) Stapf et Hubb. : Etude comparée de descendance (F2 et rétrocroisements) issues de croisements entre plusieurs géniteurs cultivés et spontanés. Thèse doctorat 3<sup>e</sup> cycle. Paris XI Orsay, 121 p.
- MENGESHA M.H. et PRASADA RAO K.E., 1982 — Current situation and future of sorghum germplasm. Sorghum in the eighties. *Proceedings of the International Symposium on Sorghum*, Vol 1, 2-7 november 1982, ICRISAT Center, Patancheru A.P., India

- PERNÈS J.**, 1983 — La génétique de la domestication des céréales. *La Recherche*, Vol 14, n° 145.
- REY-HERME.**, 1982 — Les relations génétiques entre les formes spontanées et les formes cultivées chez le mil (*Pennisetum* sp.). Thèse doctorat 3<sup>e</sup> cycle. Spécialité Développement et Amélioration des Végétaux. Paris XI, Orsay, 112 p.
- SAPIN P., REYNARD A.**, 1968 — La culture de sorgho de décrue dans la vallée du fleuve Sénégal. Quelques techniques culturales simples pour son amélioration. *L'Agronomie Tropicale*, Vol XXIII, n° 8.
- TOSTAIN S.**, 1991 Enzyme diversity in pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) 3. Wild millet. **ORSTOM**, B.P. 11416, Niamey, Niger.

### Annexe I : Nombre indicatif des échantillons de mils et sorghos prospectés par pays

N°	CULTURE PAYS	MILS	SORGHOS
1	AFRIQUE DU SUD	115	659
2	ANGOLA	-	29
3	BENIN	138	4
4	BOTSWANA	45	190
5	BURKINA FASO	387	216
6	CAMEROUN	191	835
7	CAP VERT	1	-
8	CENTRAFRIQUE	62	39
9	CONGO	3	-
10	COTE D'IVOIRE	144	197
11	EGYPTE	-	22
12	ETHIOPIE	1	4113
13	GAMBIE	17	1
14	GHANA	246	64
15	GUINEE	72	-
16	GUINEE BISAU		
17	KENYA	69	761
18	LESOTHO	-	7
19	MADAGASCAR	-	1
20	MALAWI	245	370
21	MALI	1042	111
22	MAROC	3	3
23	MAURITANIE	1	-
24	MOZAMBIQUE	28	
25	NAMIBIE	-	1
26	NIGER	1033	408
27	NIGERIA	1059	1173
28	SENEGAL	361	230
29	SIERRA LEONE	55	3
30	SOMALIE	3	125
31	SOUDAN	559	2255
32	SWAZILAND	-	19
33	TANZANIE	138	133
34	TCHAD	62	138
35	TOGO	129	-
36	OUGANDA	48	612
37	ZAIRE	-	24
38	ZAMBIE	81	210
39	ZIMBABWE	175	186

## Annexe II. Evaluation et utilisation des écotypes locaux de mil en amélioration **variétale**



### Annexe III : Entrées identifiées comme parents après évaluation

Date de semis : 31/07/90. Date de récolte : 15-20/12/90. Fertilisation : 150 kg/ha 10-18-18 ; 50 kg/ha urée à la montaison. Écartement : 0,80 m entre les lignes, 0,80 m entre les poquets sur la ligne. Répétition : 4

ENTREES	ETP		HPGT		LOC		P1000G
	cm	CV ( % )	cm	CV ( % )	cm	CV ( % )	
M(4-90)	88	7,5	319	16,2	32	20	12
M(10-90)	85	5,6	304	10,3	29	17,6	11
M(11-90)	99	4,3	332	12,3	32	15,7	10,12
M(12-90)	96	5,6	326	8,7	32	13,7	10,15
M(13-90)	106	5	339	9,8	30	11,9	0
M(19-90)	94	6,5	325	12,3	31	18,1	09,54
M(23-90)	100	4,4	302	5,3	24	14,3	0
M(24-90)	101	5,8	280	9,9	22	17,3	1
M(33-90)	101	5,9	266	21,5	25	15,7	1
M(37-90)	95	5,4	320	6,6	24	10,9	1
M(38-90)	101	6,2	317	18,6	23	19,7	0
M(46-90)	92	8,7	280	17,1	25	15	0
M(55-90)	89	5,4	323	7,2	33	14,5	1
M(58-90)	95	6,6	360	13,2	32	17,8	1
M(68-90)	95	5,5	344	9,3	23	10,7	1
M(72-90)	87	5,7	332	16,5	31	14,7	09
M(75-90)	90	8,5	316	12,2	31	22,2	13
M(6-89)	78	8,2	245	16,8	30	19	-
M(9-89)	81	8,1	292	14,3	31	13	-
M(28-89)	79	4,9	207	14,1	28	14,5	-
M(31-89)	77	6,9	257	16,9	30	14,2	-
M(41-89)	81	5,4	322	10,6	31	16,5	-
M(49-89)	78	4,3	240	13	29	13,3	-
M(52-89)	81	3,9	270	8,5	31	10,2	-
M(55-89)	77	6,2	271	8,9	33	13,3	-
M(59-89)	79	6,0	234	15,6	30	1,8	-
M(68-89)	85	5,9	305	17,6	30	10,1	-

## **Annexe IV : Constitution et sélection de bulks F1 de sorgho. Evaluation des 197 écotypes**

- An 1

Séparation en 2 groupes de précocité :

— Sorghos semi-tardifs (115-130 jours) à grains petits et vitreux (centre Nord et Nord-Ouest).

— Sorghos tardifs (135-148 jours) à gros grains farineux (Nord-Est).

- An 2

— Bulk des F1 écotype par écotype

— Choix des meilleurs bulks F1AF : 6 à 7 dans le groupe des semi-tardifs, 10 dans le groupe des tardifs.

— Récolte et battage panicule par panicule des 5 AF des meilleurs bulks F1 retenus.

- An 3

— Semis panicule AF par panicule AF en groupant AF provenant d'un même bulk F1.

— Autofécondation de 6 à 7 pieds dans chaque ligne.

— Choix entre bulks.

— Battage des AF des bulks F1 choisis pour des essais comparatifs de rendement.

## **Annexe V : Exploitation directe de la collection**

- An 1

Semis en ligne et en pollination (10 pieds sont autofécondés par écotype). Choix des 10 meilleurs écotypes dans le groupe des semi-tardifs et des 10 meilleurs écotypes dans le groupe des tardifs. Constitution de 50 AF dans le groupe des semi-tardifs et de 50 AF dans le groupe des tardifs à partir des 10 pieds préalablement autofécondés.

- An 2

Collection testées des 50 AF du groupe semi-tardifs et des 50 AF du groupe des tardifs. 20 pieds sont AF dans chaque ligne. Selon le bon rendement grain et le bon aspect général, 3 écotypes sont choisis par groupe de précocité (2 à grains blancs + 1 à grains rouges). Dans chaque écotype les deux meilleurs lignées sont retenues. Les AF de ces 12 lignées (3X2 + 3X2) sont conservées pour les essais comparatifs.

# Organisation du pool génique de *Setaria italica* (L.) P. Beauv. et exploitation des ressources génétiques d'espèces spontanées

Roger ZANGRÉ, Elizabeth NGUYEN-VAN \*, Bouchra RHERISSI \*\*  
et Irène TILL-BOTTRAUD \*\*\*

**Résumé :** Une synthèse des résultats obtenus au laboratoire GPD (Génétique et Physiologie du Développement des Plantes) sur la domestication du millet cultivé, *Setaria italica*, l'organisation du complexe de l'espèce spontanée, *Setaria viridis* et sur l'utilisation des ressources génétiques des formes spontanées en amélioration des plantes, est proposée. Des travaux d'évaluation de la collection constituée par le GPD et des descendances d'hybrides intra (cultivé x cultivé) et inter (sauvage x cultivé) spécifiques, ont été réalisés sur la base d'études de caractères morphologiques, de marqueurs enzymatiques et de coloration, et d'analyse cytogénétique. Les principales conclusions sont :

—le millet cultivé, *Setaria italica* a eu probablement une domestication multisite à partir de *Setaria viridis* ;  
—le complexe de *Setaria viridis* comprend plusieurs compartiments caractérisés par au moins 4 niveaux de ploïdie avec un nombre chromosomique de base égal à 9 ;  
—*Setaria italica* et *Setaria viridis* sont diploïdes ( $2n = 18$ ) et appartiennent au même compartiment.

En dépit de l'apparition d'anomalies génétiques (stérilité en F<sub>1</sub>, distorsion de ségrégation en F<sub>2</sub>), dans les hybrides interspécifiques, l'utilisation des ressources génétiques spontanées semble être envisageable parmi les stratégies d'amélioration du millet cultivé.

**Mots-clés :** *Setaria*, domestication, complexe d'espèces, pool génique, ressources génétiques, hybridation.

**Abstract :** A synthesis of results obtained on the domestication of foxtail millet (*Setaria italica*), the wild foxtail millet (*Setaria viridis*) complex organization and the use of wild genetic resources for plant breeding, is proposed. Germplasm evaluation for genetic diversity as well as cross studies within cultivated forms and between wild and cultivated forms were performed at morphological, isoenzymatic and cytogenetic levels.

INERA-Kamboisé 01, BP 476 Ouagadougou 01, Burkina-Faso.

\* BRG, 57 rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05. GPD-CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

\*\* Université Ibnou Zohr, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Agadir, Maroc.

\*\*\* Université Paris-Sud, Bât. 362, 91405 Orsay cedex, France.

The *S. viridis* complex is constituted by different gene pools with at least 4 ploidy levels and 9 as basic chromosomal number. *S. italica* and *S. viridis* are both diploid ( $2n = 8$ ) and have the same gene-pool. In spite of genetic anomalies (F1 hybrids sterility, F2 segregation distortions...) in the interspecific hybrids, spontaneous millet genetic resources utilisation appears to be possible as a breeding strategy of cultivated millet.

*Key-words:* *Setaria*, domestication, gene pool, genetic resources, hybridation.

## Introduction

Le millet cultivé *Setaria italica* est une céréale de domestication plus ancienne que le maïs et le riz (Callen, 1967 ; Sakamoto, 1987 ; Harlan, 1975 ; Renfrew, 1973), classée actuellement comme mineure à cause de son déclin au profit d'autres cultures (maïs, riz...). Il se différencie en deux sous-espèces *moharia* (fourrager) et *maxima* (céréalière). Des données archéologiques et génétiques font remonter sa domestication à 5 000 ans en Chine (Ho, 1969, 1977) et 2 000 ans en Europe avant notre ère (De Wet *et al.*, 1979). Il est aussi établi que cette domestication s'est faite à partir de *Setaria viridis*, espèce spontanée partageant avec *Setaria italica* l'autogamie et la diploïdie ( $2n = 18$ ) (Nguyen-Van and Pernès, 1985). Par ailleurs les hybrides obtenus entre les deux espèces sont d'une fertilité acceptable (Li *et al.*, 1945 ; De Wet *et al.*, 1979 ; De Cherisey *et al.*, 1985) et permettent d'envisager des introgressions dirigées de gènes des formes spontanées dans le génome cultivé (Darmency and Pernès, 1985 ; Darmency *et al.*, 1987). Le genre *Setaria* renferme en outre d'autres espèces spontanées connues dont l'ensemble forme selon la classification de Jusuf (1983), le complexe d'espèces de *S. viridis*. Dans la perspective de réintroduire la culture du millet en France (Brabant *et al.*, 1981), Jean Pernès a impulsé dans le cadre du laboratoire GPDP du CNRS, entre 1979 et 1985, des études sur la diversité génétique (Cherisey *et al.*, 1985 ; Jusuf et Pernès, 1985), et des hybridations inter et intraspécifiques du millet (Darmency et Pernès, 1985 ; Darmency *et al.*, 1987 ; Poirier-Hamon et Pernès, 1986). Le présent article a pour but de faire la synthèse des résultats obtenus qui permettent d'expliquer l'histoire évolutive du millet, l'organisation du complexe d'espèces et d'entrevoir des possibilités d'exploitation des formes spontanées dans l'amélioration génétique de *S. italica*.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Le matériel étudié provient de la collection du GPDP comprenant environ 730 écotypes cultivés et spontanés, constituée à partir de différentes sources : donation du Professeur Myagi (Japon), prospections en Chine, en France..., échanges avec différents instituts, représentant l'Europe, l'Asie, l'Afrique et l'Amérique. Pour les besoins de chaque étude, un échantillonnage judicieux de ce matériel a été réalisé (Tableau 1).

Tableau 1 : Matériel végétal

Etudes	<i>S. italica</i>	<i>S. viridis</i> min maj	<i>S.</i> <i>verticillata</i>	F1 (c x c)	F1 (s x c)	HTV (s x c) x c	Génération suivantes
Diversité génétique	121	290 min					
Variabilité enzymatique	223	45 min	240				
Etudes génétiques	10	1 min		5	1		a
Analyse d'hybridations interspécifiques	9	4 min 3 maj	2		9	1	a
Introgression de gènes sauvages	1	1 min 1 maj			2		a
Total	364	341 min 4 maj	242	5	12	1	a

Abréviations : min = *S. viridis* minor. maj = *S. viridis* major. c = cultivé. s = sauvage. HTV = Hybride 3 voies. a = F2 et/ou F3 étudiées.

## Caractères morphologiques

La caractérisation morphologique a été faite sur 40 caractères parmi lesquels on a retenu les plus représentatifs de la variabilité du complexe des *Setaria* : 10 caractères pour les études de diversité génétique et 19 pour les études d'introgession (précocité, vigueur, tallage, rendement...).

## Marqueurs enzymatiques

Nous avons analysé 26 allèles issus de 7 systèmes enzymatiques dans les études de diversité et de variabilité génétiques. Les systèmes utilisés sont : estérase (Est-1-2-3) ; phosphatase acide (Acph-1) ; glutamate oxaloacétate transaminase (Got-1-2) ; malate déshydrogénase (Mdh-1-2) ; alcool déshydrogénase (Adh-1) ; 6-phosphogluconate déshydrogénase (6Pgd-1-2) ; peroxydase (Pox-1). Les techniques d'électrophorèse sont décrites par de Cherisey *et al.* (1985).

## Autres caractères

Des caractères qui différencient les formes cultivées des formes sauvages ont également été étudiés : dormance, caducité, stérilité (mitoses et méioses), faiblesse en F2, résistance aux herbicides, polyphénol oxydase (PPO), coloration du collet, de l'angle gaine/limbe, des glumes et des téguments.

## Méthodes d'analyse

Les données morphologiques et enzymatiques ont fait l'objet d'analyses statistiques multivariées utilisant l'analyse en composantes principales (ACP), l'analyse factorielle discriminante (AFD) et l'analyse factorielle des correspondances (AFC). En outre, différents indices de génétique des populations (distances de Nei, de Mahalanobis...), et la méthode des nuées dynamiques de Diday ont permis de décrire la diversité et la variabilité génétiques de ce complexe. Les détails de ces méthodes sont décrits par Nguyen-Van and Pernès (1985) et Jusuf and Pernès (1985). L'analyse des autres caractères est décrite par de Cherisey *et al.* (1985), Poirier-Hamon and Pernès (1986) et Darmency *et al.* (1987).

## Résultats

### Eléments de domestication de *Setaria italica*

#### Diversité morphologique

Les échantillons étudiés (121 cultivars) sont fortement structurés en plusieurs types morphologiques d'origine tempérée et tropicale. En fait, la dispersion observée oppose principalement les sous-espèces *moharia* et *maxima*

dont la classification en sous-groupes fait ressortir 7 types fondamentaux et quelques individus non classés (Nguyen-Van and Pernès, 1985). Certains types sont nettement régionalisés. La classification selon l'origine géographique est mieux précisée dans l'étude de la variabilité enzymatique.

### Polymorphisme enzymatique

Les systèmes étudiés sont peu polymorphes ; ils permettent malgré tout de différencier les groupes morphologiques : 1) Les *moharia* semblent plus variables que les *maxima*. 2) Il y a plus d'allèles communs entre un *moharia* et un *maxima* de la même région qu'à l'intérieur d'une même sous-espèce provenant de régions différentes. 3) Une classification des types morphologiques par les 26 allèles a donné 8 groupes. Le groupe 4 s'est séparé en deux *zymogrammes* différents caractérisant les céréaliers précoces de France de ceux de Chine (Figure 1).

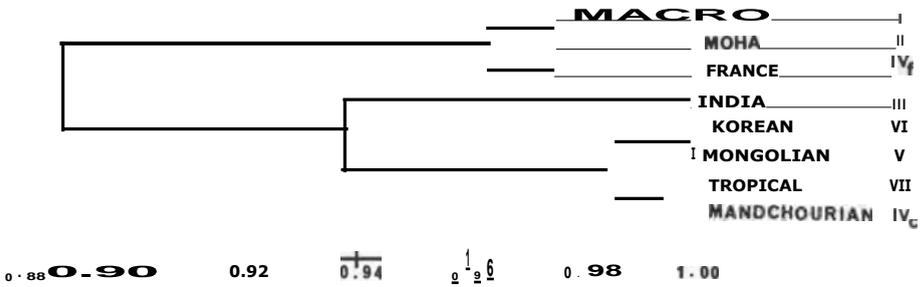


Fig. 1. — Dendrogramme des 8 groupes régionaux décrits au moyen de l'indice d'identité de Nei (Nguyen-Van and Pernès, 1985)

L'étude des fréquences alléliques régionales réalisée sur des échantillons incluant *S. viridis* a montré que les différences entre *S. viridis* et *S. italica* se résument par la présence respective de 4 et de 3 allèles rares. Sur le plan de la variabilité intrarégionale, *S. viridis* s'est montré plus polymorphe que *S. italica*, bien que les échantillons étudiés de *S. viridis* ne proviennent que de 2 régions (France et Chine). La variabilité interrégionale des races cultivées, étudiée par l'analyse discriminante a conduit à l'identification de centres de diversité régionaux (Figure 2). De l'analyse de tous les échantillons, *S. viridis* compris, il ressort que les différences observées entre populations sont plutôt régionales que taxonomiques. Les distances génétiques mesurées entre *S. italica* et *S. viridis* issus d'une même région, ne sont pas toujours supérieures à celles entre populations de la même espèce provenant de régions différentes.

L'étude de populations de *S. viridis* a montré une faible variabilité intrapopulations et une faible différenciation interpopulations (Rherissi, 1989). L'échantillonnage utilisé a permis d'identifier 2 groupes régionaux constitués par le couple *S. viridis* — *S. italica* de la même région :

- un groupe asiatique (Chine, Corée, Japon),
- un pool européen (France-Europe Centrale) (Figure 3).

Les autres groupes identifiés se projettent à l'écart de ces 2 groupes. Il est possible que ces groupes constituent aussi des pools avec les formes spontanées des régions concernées (l'étude n'a pu être réalisée).

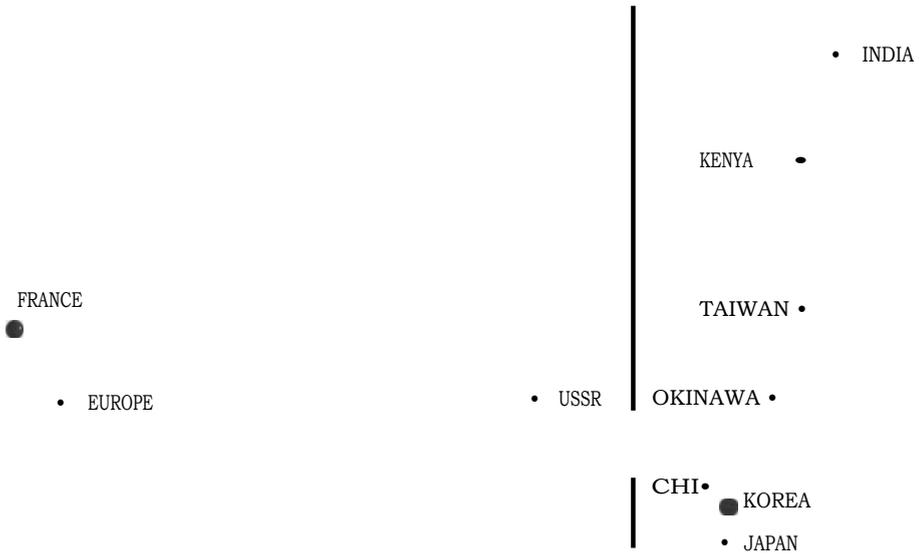


Fig. 2. Représentation graphique des régions sur le plan canonique 1-2 (Jusuf and Pernès, 1985).

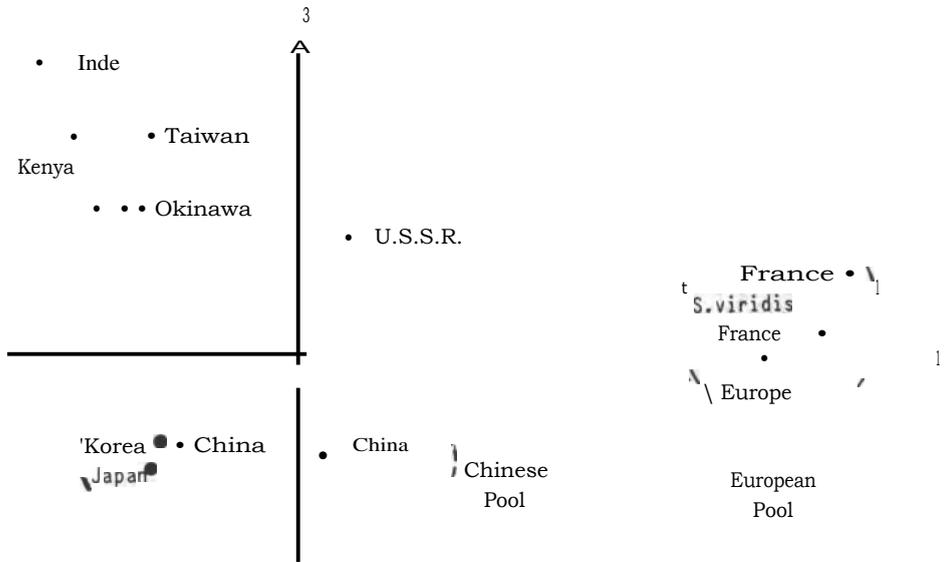


Fig. 3. Représentation graphique des régions de *S. italica* et *S. viridis* sur le plan canonique 1-3 (Jusuf and Pernès, 1985).

Des études d'hybridations intraspécifiques entre cultivars d'origine française et chinoise ont révélé des anomalies génétiques, stérilités partielles des hybrides H, faiblesse héréditaire, distorsion de ségrégation et méioses imparfaites (Croullebois *et al.*, 1989). Ceci contribue à accentuer davantage les

différences entre les 2 pôles. Des croisements entre sauvages chinois et français n'entraînent aucune stérilité mais présentent des distorsions de ségrégation pour des marqueurs enzymatiques en F2 (Dillmann, comm. pers.).

## Complexe d'espèces de *S. viridis* et utilisation des ressources génétiques spontanées

### Etude des hybridations interspécifiques

Différents croisements effectués entre *S. viridis* et *S. italica* ont montré des stérilités partielles des hybrides F1 et des distorsions de ségrégation en F2 (Zangré, 1986). Les hybridations entre les 2 espèces sont néanmoins faciles à réaliser et se produisent même spontanément avec un taux d'allofécondation de 0,4 à 2,8 % (Darmency *et al.*, 1987). Des hybrides spontanés ont été trouvés dans les champs du Maine et Loire (cf poster Reboud *et al.* ; Till-Bottraud *et al.*, 1992). Il semble que les anomalies observées ne soient pas en rapport avec l'origine géographique des parents, comme cela était le cas entre parents cultivés d'origine géographique éloignée. Des croisements réalisés entre *S. verticillata* (L.) P. B., espèce spontanée de génome B ( $2n = 4x = 36$ ) et *S. italica*, ont par contre, donné des hybrides complètement stériles. Ces hybrides sont relativement fréquents en Maine et Loire (Till-Bottraud *et al.*, 1992). En dépit d'un traitement à la colchicine, la fertilité des descendances à tendance cultivé n'a pu être entièrement restaurée. Il y a eu dans certaines descendances élimination des chromosomes cultivés et retour au parent *S. verticillata* (Poirier-Hamon and Pernès, 1986). Les croisements avec *S. glauca*, artificiels ou naturels, sont totalement stériles.

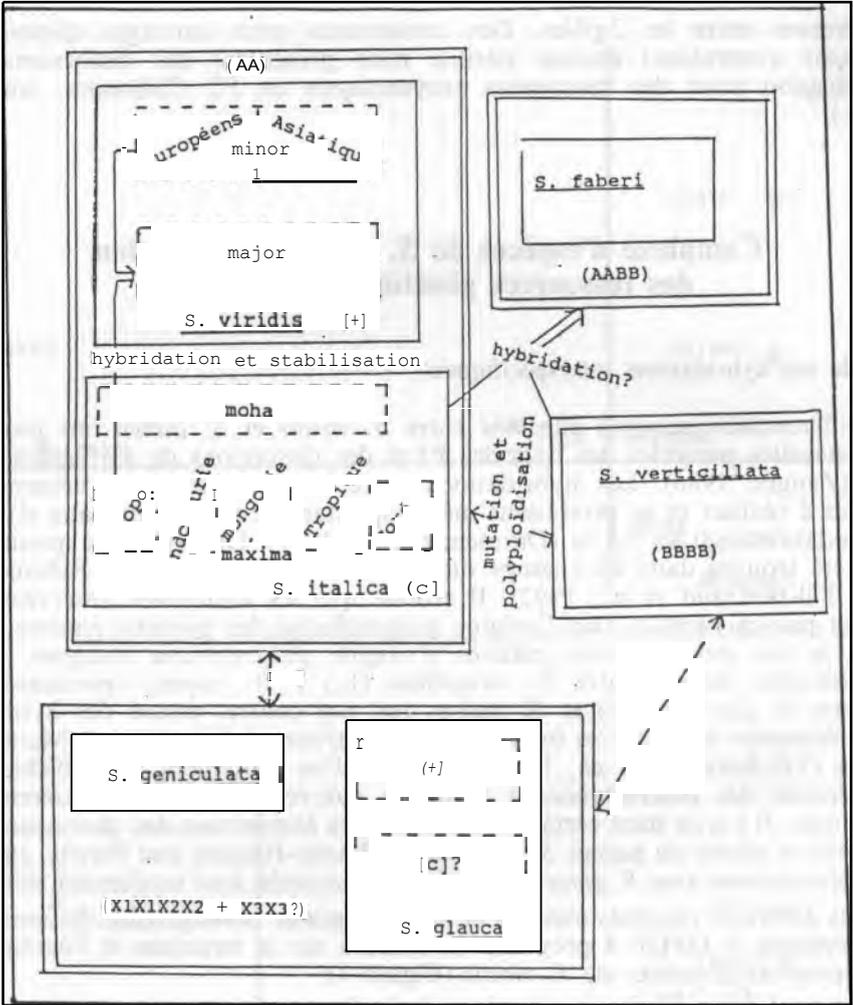
Les différents résultats obtenus et les éléments de bibliographie disponibles ont conduit le GPDP à proposer un schéma sur la structure et l'évolution du complexe d'espèces de *S. viridis* (Figure 4).

On peut donc décrire le complexe de la façon suivante :

- Un pool primaire composé de *S. italica et viridis* (nombre chromosomique  $2x$ ),
- un pool secondaire composé de *S. verticillata et faberi* (nombres chromosomiques  $2x$  et  $4x$ ),
- un pool tertiaire composé de *S. glauca* (nombres chromosomiques  $4x$  et  $8x$ ).

### Utilisations des ressources génétiques spontanées

Des croisements ont été réalisés entre *S. italica* et les 2 races spontanées de *S. viridis* (*minor et major*) en vue d'étudier les introgressions possibles entre espèces et plus particulièrement la résistance cytoplasmique à l'herbicide atrazine de l'espèce spontanée (Zangré, 1986). Toutes les descendances des croisements *S. viridis* x *S. italica* sont résistantes, tandis que les croisements réciproques donnent des individus sensibles. Les hybrides F1 sont intermédiaires entre le cultivé et le sauvage pour plusieurs caractères morpholo-



- complexe d'espèce
- IL — pool génique
- | — compartiment
- r ---| sous compartiment
- origines probables
- 4 origines incertaines

Fig. 4. — Schéma hypothétique sur la structure et l'évolution du complexe d'espèces de *Setaria viridis*.

gigues, et ressemblent à *S. viridis* var. *major* (mais ce dernier est stabilisé). Les **introgressions** ont permis d'obtenir sur le plan morphologique des descendances à tendance cultivé : bonne hauteur de plante, faible tallage, bonne précocité, grands épis bien remplis et lourds, poids de 1 000 grains élevé. Cependant, certaines caractéristiques du parent spontané demeurent : réduction de la fertilité de l'hybride, caducité et dormance des graines. Toutefois, du fait de leur déterminisme simple (Tableau 2), il serait possible de les éliminer par des autofécondations successives ou des croisements en retour sur le parent cultivé (en F3 certaines familles sont fixées pour la non caducité et la non dormance des graines (Tableau 3).

Tableau 2: Hérité de la caducité et de la *polyphénol oxydase* (PPO)

	Ségrégation	X <sup>2</sup>	Nombre de gènes	
Caducité	13 : 3	0,240	2 gènes indépendants	Zangré G.R. - 1986
PPO	3 : 1	0,379	1 gène	Poirier-Hamon S. 1986

Tableau 3 : Comportement de familles F3 et F4 pour la caducité et la germination des graines

Nombre de familles		Caducité		Sources	Germination moyenne en %	Sources
F3	F4	IF	INF			
10		65	35	Poirier-Hamon S. 1986	69,41	Poirier-Hamon S. 1986
14		186	464	Zangré G.R. - 1986		
	4				74,72	Poirier-Hamon S. 1986

IF = Individus fixés. INF = Individus non fixés

## Discussion

Huit groupes régionaux ont été identifiés. La caractérisation de ces groupes se trouve renforcée par la présence d'au moins 2 pools distincts, l'un européen, constitué par le couple *S. viridis* — *S. italica* d'Europe, l'autre chinois constitué par le couple *S. viridis* — *S. italica* de Chine. Cette différenciation régionale **Chine/Europe** se trouve encore accentuée par l'apparition d'anomalies génétiques dans les descendances de croisements entre cultivars et entre formes sauvages chinois et français. Par conséquent, l'existence de millet cultivé dans ces deux régions aussi éloignées géographiquement et l'importance du polymorphisme enzymatique constaté, accréditent l'hypothèse d'une domestication indépendante du millet en Europe (sans l'URSS) et en Chine. Toutefois, des hypothèses sur un centre de domesti-

cation en Afghanistan (Sakamoto, 1987) et au Nord-Ouest de l'Inde (Nakao, 1967) ont été émises.

*S. viridis* se présente comme l'espèce spontanée la plus apparentée à *S. italica*. Ceci est confirmé par le fait que certains marqueurs (morphologiques et enzymatiques) ont le même mode de transmission dans les 2 espèces (Till-Bottraud et Brabant, 1990). Des hybridations spontanées se produisent entre les 2 espèces avec transfert de gènes, malgré la présence de stérilités dans les descendance. Les études d'introgressions ont montré qu'il était possible de récupérer des descendance à tendance cultivée ayant incorporé des caractères intéressants de *S. viridis* comme la résistance à l'atrazine. Les hybrides F1 entre *S. viridis* et *S. italica* sont très comparables à la race *S. viridis* var. *major*. Cette race plus proche du millet cultivé constitue une mauvaise herbe dans les champs de millet et proviendrait de l'hybridation spontanée entre *S. viridis* et *S. italica*. On aurait eu tendance à penser que les races fourragères sont des formes intermédiaires de domestication vers les races céréalières mais l'hérédité de certains caractères morphologiques (tallage, précocité) indique que la race *moharia* est un idéotype issu d'une domestication directe.

Les résultats analysés dans cet article montrent les diverses possibilités d'utilisation des ressources génétiques spontanées dans l'amélioration de *S. italica*. En outre, ils établissent que la domestication du millet s'est faite probablement en plusieurs endroits à partir de *S. viridis*. Si avec le matériel disponible on a pu supposer deux centres de domestication indépendante (Europe et Chine), des études complémentaires incluant d'autres régions et toutes les formes cultivées et spontanées restent cependant nécessaires pour en savoir plus sur cette domestication. Les croisements *interpools* géniques *S. verticillata* x *S. italica* ont mis en évidence l'importance des barrières reproductives qui pourraient exister lorsqu'on s'intéresse au transfert de gènes de *S. verticillata* à *S. italica*. Néanmoins l'étude de croisements aussi bien à l'intérieur du compartiment spontané de *S. viridis* qu'entre *S. italica* et d'autres *pools* géniques comme *S. glauca* est nécessaire pour mieux comprendre l'organisation du complexe d'espèces de *S. viridis*.

## Bibliographie

- BRABANT P., BELLARD J., METAILIE G., NGUYEN-VAN E., POIRIER S., POIRIER B. et PERNÈS J., 1981 — Données préliminaires pour la réintroduction et la culture du millet *Setaria* en France. *J. Agric. Trad. Bot. Appl.*, **28** (3-4) : 310-328.
- CALLAN E.O., 1967 — The first new world cereal. *Amer. Antiquity*, **32** : 535-538
- CHERISEY H. (de), BARRENECHE T.M., JUSUF M., OUIN C., PERNÈS J., 1985 — Inheritance of some marker gene in *Setaria italica* (L.) P. Beauv. *Theor. Appl. Genet.*, **71** : 57-60.
- CROULLEBOIS M.L., BARRENECHE M.T., De CHERISEY H. et PERNÈS J., 1989 Intraspecific differentiation of *S. italica* (L.P.) B. : studies of abnormalities (weakness segregation distortion and partial sterility) observed in F1, F2 generations. *Genome*, **32**, vol. 2 : 203-207.
- DARMENCY H. et PERNÈS J., 1985 — Use of wild *Setaria viridis* (L.) Beauv. to improve triazine resistance in cultivated *S. italica* (L.) by hybridization. *Weed Res.*, **25** : 175-179.

- DARMENCY H., ZANGRÉ G.R. et PERNÈS J., 1987 — The wild weed crop complex in *Setaria italica* : a hybridization study. *Genetica*, 75 : 103-107.
- HARLAN J.R., 1975 — *Crops and Man*. Madison, Amer. Soc. Agro. and Crop Sci. Soc. Amer.
- HO P.T., 1969 — The loess and the origin of chinese agriculture. *Amer. Hist. Rev.*, 75 : 1-36.
- HO P.T., 1977 — The indigenous origins of chinese agriculture. in C.A. Reed (ed), *Origins of agriculture*, pp. 413-484. The Hague, Mouton.
- JUSUF M. et PERNÈS J., 1985 — Genetic variability of foxtail millet (*Setaria italica*). Electrophoretic study of five isozyme systems. *Theor. Appl. Genet.*, 71 : 57-60.
- JUSUF M., 1983 — *Variabilité des Setaria italica en relation avec la distribution géographique et la domestication. Approche par l'étude des polymorphismes enzymatiques*. Thèse de 3<sup>e</sup> Cycle. Univer. Orsay Paris-XI.
- LI H.W., LI C.H., PAO W.K., 1945 — Cytological and genetical studies of interspecific cross between the cultivated foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv. and the green foxtail millet *Setaria viridis* (L.) Beauv. *J. Am. Soc. Agron.*, 37 : 32-54.
- NAKAO S., 1967 — Discussion on the agricultural origins. In Morishita and Kira (eds), *Nature-Ecological studies*, pp. 32-494.
- NGUYEN-VAN E. et PERNÈS J., 1985 — Genetic diversity of foxtail millet (*Setaria italica*) In : *Plant population biology symposium*. Springer, Berlin, Heidelberg, New-York, pp. 98-104.
- PERNÈS J., 1984 — *Gestion des ressources génétiques des plantes*. T. II. ACCT (ed), Paris, 162 p.
- POIRIER-HAMON S., 1986 — Analyse et étude génétique d'hybrides interspécifiques dans le genre *Setaria* : *Setaria italica* (millet cultivé) avec *Setaria viridis* et *Setaria verticillata*. Thèse EPHE, 71 p.
- POIRIER-HAMON S. et PERNÈS J., 1986 — Instabilité chromosomique dans les tissus somatiques des descendances d'un hybride interspécifique *Setaria verticillata* (P. Beauv.). *C. R. Acad. Sc.*, Paris, T 302, Série II, 9 : 319-324.
- RENFREW J.M., 1973 — *Paleoethnobotany*. London, Methuen & Co.
- RHERISSI B., 1989 — *Structuration de complexe des sétaires tempérées (Setaria sp.) : approche par l'étude de la variabilité génétique, des flux de gènes et de la compétition interspécifiques des formes sauvages de différents pools géniques*. Thèse de 3<sup>e</sup> Cycle. Univ. Paris-VII, 110 p.
- SAKAMOTO S., 1987 — Origin and phylogenetic differentiation of cereals in Southwest Eurasia. in : *Domesticated plants and animals of Southwest Eurasian agropastoral culture complex*. Tani Y. and Sakamoto S. (eds).
- TILL-BOTTRAUD I. et BRABANT P., 1990 — Inheritance of some mendelian factors in intra — and interspecific crosses between *Setaria italica* and *Setaria viridis*. *Theor. Appl. Genet.*, 80 : 687-692.
- TILL-BOTTRAUD I., REBOUD X., BRABANT P., LEFRANC M., RHERISSI B., VEDEL F., DARMENCY H., 1991 — Outcrossing and hybridization in wild and cultivated foxtail millets : consequences for the release of transgenic crops. *Theor. Appl. Genet.* (sous presse).
- De WET J.M.J., OESTRY-STIDD L.L. et CUBERO J.I., 1979 — Origins and evolution of foxtail millets. *J. Agric. Trad. Bot. Appl.*, 26 : 53-63.
- ZANGRÉ G.R., 1986 — *Contribution à l'étude de la domestication et de l'amélioration du millet Setaria italica (L.) P. B. : analyse de descendances d'un croisement S. viridis (L.) P. B., Setaria italica (L.) P. B.* Thèse de Docteur Ingénieur Univ. de Rennes, 88 p.



# Etude électrophorétique des variétés d'orge cultivées en Tunisie

Farhat CHIBANI \*, Nejjib TRIGUI \*, Aly RAIES  
et Mohamed MARRAKCHI \*\*

*Résumé* : Parmi les protéines de réserve de l'orge, la fraction prolamine (hordéines) est la plus importante. Celle-ci est analysée par des techniques biochimiques notamment l'électrophorèse mono et bi-dimensionnelle. Cette étude a permis de distinguer les A, B et C-hordéines de poids moléculaires respectifs de 14-20 kD, 30-40 kD et 45-66 kD. L'électrophorèse SDS-PAGE appliquée pour ces protéines s'est révélée insuffisante quant à la distinction de certaines variétés. L'analyse du polymorphisme enzymatique a porté sur trois systèmes : les estérases (EST), la glutamate oxalo-acétate transaminase (GOT) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD). L'utilisation de la technique IEF/SDS-PAGE permet de les distinguer par la présence de « spots » spécifiques. Les variétés d'orge cultivées en Tunisie caractérisées par ces méthodes sont : Cérés, Faiez, Martin, Rihane, Roho et Taj.

*Mots-clés* : orge, hordéines, polymorphisme, électrophorèse.

*Abstract* : The hordeins are the more important fraction in barley seed stored proteins. They were identified by several biochemical technics especially monodimensional electrophoresis. This study allowed to distinguish the A, B and C-hordeins with a molecular weight of 14-20 kD, 30-40 kD and 45-66 kD respectively. The SDS-PAGE used for the hordeins shows that this technic is insufficient for the distinction of some varieties. The enzyme polymorphism is studied with : esterases (EST), glutamate oxalo-acetate transaminase (GOT) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD). The use of IEF/SDS-PAGE technic allows the identification by the presence of specific spots. The Tunisian cultivated barley varieties characterized in this study were Cérés, Faiez, Martin, Rihane, Roho and Taj.

*Key words* : Barley varieties, hordeins, polymorphism, electrophoresis.

## Introduction

Les variétés d'orge (*Hordeum vulgare* L.) cultivées en Tunisie sont à grains vêtus. Cette particularité morphologique ainsi que d'autres caractères relatifs à l'épi et au développement végétatif offrent de très grandes possibilités en vue de leur identification. Cette méthode, bien que toujours très employée, a cependant l'inconvénient d'être limitée par le fait que la presque totalité des caractères observés sur la plante et sur le grain fluctuent selon les facteurs **agro-climatiques**, avec une tendance vers l'uniformisation. Ceci rend très difficile, voire même impossible, une discrimination **variétale**. Ce qui a conduit les chercheurs à l'utilisation de plusieurs techniques biochimiques comme méthodes d'identification des cultivars d'orge (Wrigly *et al.*, 1982 ; Montembault *et al.*, 1983 ; Cooke, 1984 ; Marchylo et Kruger, 1985 ; Burbidge *et al.*, 1986).

Dans cette étude, nous caractérisons six variétés d'orge cultivées en Tunisie, à savoir : Cérès, Faiez, Martin, Rihane, Roho et Taj en employant la technique d'**électrophorèse** des protéines enzymatiques et des protéines de réserve, en particulier la fraction prolamine de l'orge appelée **hordéines**. Cette dernière fraction représente environ 50 % des protéines totales du grain mature (Shewry *et al.*, 1985). Elle est génétiquement stable et indépendante des conditions de culture (Marchylo *et al.*, 1980).

Le polymorphisme enzymatique a été étudié à travers trois systèmes : les **estérases (EST)**, la **glutamate oxalo-acétate transaminase (GOT)** et la **6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD)**.

## Matériels et méthodes

### Matériel végétal

Les variétés d'orge étudiées ont été fournies par le laboratoire de génétique de l'Institut National Agronomique de Tunis (INAT). Quatre variétés : Faiez, Rihane, Roho et Taj ont été inscrites au catalogue officiel de l'Institut National de Recherche Agronomique de Tunis (INRAT) en 1985. Les deux autres, Cérès et Martin, sont considérées comme des variétés anciennes. Les variétés Rihane et Martin sont à 6 rangs. Cérès, Roho, Faiez et Taj sont des variétés à deux rangs.

### Extraction des hordéines

L'extraction est réalisée soit à partir de la farine d'un mélange de grains, soit à partir des grains pris individuellement d'une même variété, selon la méthode de Doll et Andersen (1981). Afin d'éviter les interactions susceptibles de se produire entre certains constituants des grains, comme les **polyphénols** et les protéines, les grains sont préalablement débarrassés des glumes et des **glumelles** adhérentes.

Les grains sont broyés à température ambiante dans 1 ml de tampon d'extraction fraîchement préparé dont la composition est la suivante (Blake *et al.*, 1982) : 55 % d'isopropanol, 4 mM de dithiothréitol (DTT) et 0,37 M Tris-HCl pH 8,8.

Les broyats sont incubés à 60 °C pendant 60 mn puis centrifugés à 9800 g pendant 10 mn dans des microtubes. Le surnageant obtenu est l'extrait hydroalcoolique contenant les hordéines. Afin d'empêcher leur réoxydation (Lane, 1978) ces protéines sont alkylées par addition de 10 µl d'iodoacétamide (0,5 M) à 50 °C pendant 15 mn (Doll et Andersen, 1981).

Les hordéines sont précipitées et partiellement purifiées par l'addition du même volume d'une solution de NaCl 0,5 M pendant une nuit à 4 °C. Après centrifugation à 9800 g pendant 10 mn, les hordéines sont reprises dans 750 µl de tampon d'électrophorèse ayant la composition suivante : 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8 ; 2 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 % glycérol, 4 mM DTT et 0,01 % de bleu de bromophénol.

### Electrophorèse des hordéines

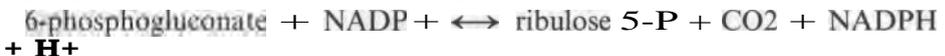
—**Electrophorèse unidimensionnelle (SDS-PAGE)** : Elle est effectuée sur gel vertical de polyacrylamide à 12,5 % en conditions dénaturantes selon la méthode de Weber et Osborn (1969) ; Laemmli (1970). La migration est menée à une intensité de courant de 20 mA/gel de 180 x 160 x 1,5 mm de dimension. Les poids moléculaires des différentes bandes sont déterminés en utilisant des protéines marqueurs connues : mélange de protéines standards Sigma (lysozyme : 14,4 kD ; inhibiteur trypsique : 21 kD ; anhydrase carbonique : 31 kD ; ovalbumine : 45 kD et sérum albumine bovine 66 kD). Les gels de polyacrylamide sont enregistrés sur un densitomètre à 570 nm après coloration au bleu de Coomassie R-250 (Doll et Andersen, 1981).

—**Electrophorèse bi-dimensionnelle (IEF/SDS-PAGE)** : La technique utilisée est celle décrite par O'farrel (1975). La première dimension, appelée isoélectrofocalisation (IEF), consiste en la séparation des protéines selon leurs points isoélectriques (pHi) dans un gradient de pH allant de 3 à 10. La deuxième dimension est une simple électrophorèse SDS-PAGE.

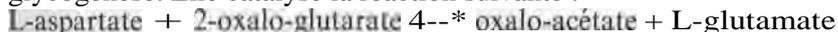
### Etude des systèmes enzymatiques

Trois systèmes ont été étudiés appartenant à trois classes d'enzymes :

—La 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD) : (EC.1.1.1.44). C'est une oxydo-réductase de la voie des pentoses. Elle transforme le 6-phosphogluconate en D-ribulose-5-phosphate selon la réaction :



—La glutamate oxalo-acétate transaminase (GOT) : (EC.2.6.1.1). C'est une amino-transférase. Elle joue un rôle très important dans les réactions de transamination conduisant à l'élimination de l'azote des acides aminés et la formation des acides cétoniques dans le cycle de Krebs et la glycogénèse. Elle catalyse la réaction suivante :



— Les **estérases** (EST) : (E.C.3.1.1.2). Elles forment un groupe d'enzymes complexe et très hétérogène. Ces enzymes hydrolysent spécifiquement les liaisons esters suivant la réaction :



Les enzymes ont été étudiés sur 4 plantules de chaque variété, âgées de 3 à 4 jours et cultivées dans des boîtes de Pétri à 25 °C et à l'obscurité. Les racines et le coléoptile de chaque plantule sont broyés dans 200 µl de tampon **ascorbate** de sodium 0,42 M pH 7,4 contenant 0,49 M de saccharose et 0,03 % de **β-mercapto-éthanol** (Sandmeier *et al.*, 1981 ; Trigui *et al.*, 1986). Les extractions sont faites à 4 °C. Les **broyats** obtenus sont centrifugés à 30 000 g pendant 10 mn. Les surnageants contenant les protéines enzymatiques sont soit utilisés immédiatement, soit conservés à — 18 °C pendant 2 à 3 jours.

La séparation des **isoenzymes** est réalisée par électrophorèse sur gel d'amidon 13 % selon les techniques de Stuber *et al.* (1977), Cardy *et al.* (1980), et Scandalios (1969). Selon le système enzymatique à étudier, deux types de gel d'amidon sont préparés. Les **isoenzymes** de la GOT et des EST sont séparés en utilisant le tampon lithium-borate pH 8,3 dont la composition est la suivante : 0,04 M hydroxyde de lithium, 0,19 M acide borique. La migration se déroule sous une intensité constante de 40 mA/gel (165 x 135 x 10 mm). Le temps de migration est de 5 à 6 heures. Les **isoenzymes** de la 6-PGD sont séparés sur gel d'amidon en utilisant un tampon histidine pH 6,5 (0,065 M L-histidine, 0,007 M acide citrique) et sous une puissance constante de 16 W/gel (185 x 165 x 10 mm).

## Résultats et discussion

Le tableau 1 montre la teneur en protéines des variétés d'orge étudiées qui varie entre 7,52 % de la matière sèche pour la variété Martin et 15,42 pour la variété Faïez.

Tableau 1 : Teneur en protéines et taux d'hordéines selon Kjeldahl des variétés d'orge étudiées

Variétés	Martin	Rihane	Taj	Cérès	Roho	Faïez
Nombre de rangs	6	6	2	2	2	2
Teneur en protéines de matière sèche	7,52	8,90	9,19	10,14	11,927	15,42
Taux d'hordéines en %	25,1	28,3	32,0	28,5	37,9	38,9

Cette teneur en protéines est utilisée comme critère de choix de la variété pour la fabrication de la bière. En effet, plus la variété est pauvre en protéines, mieux elle serait pour la malterie-brasserie en raison de sa forte teneur en glucides. Le taux des **hordéines** est en moyenne de 31,8 % comme cela a été mentionné par Jourdiar (1985).

Les polypeptides des **hordéines** séparés par électrophorèse sur gel de **polyacrylamide** peuvent être classés en trois groupes appelés **A**, **B** et **C-hordéines** (Figure 1).

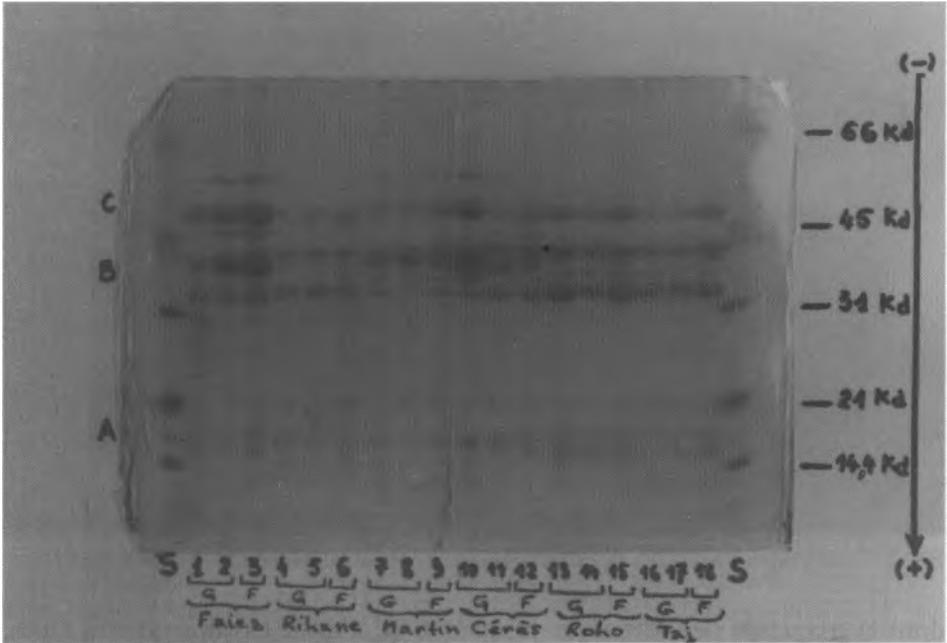


Fig. 1. — Electrophorégramme des hordéines.

G : Hordéines extraites à partir des grains.

F : Hordéines extraites à partir de la farine.

S : Mélange standard de protéines.

Les poids moléculaires de ces différents groupes de polypeptides sont estimés à :

A-hordéines 14 — 20 kD

B-hordéines 30 — 40 kD

C-hordéines 40 — 60 kD

En fait, il existe 4 groupes de polypeptides A, B, C et **D-hordéines** par ordre de mobilité électrophorétique décroissante (Shewry *et al.*, 1978) mais dans nos conditions expérimentales d'extraction, les **D-hordéines** ne sont pas obtenues.

La région de bas poids moléculaire (**A-hordéines**), décrite par Koie *et al.* (1976), présente très peu de variabilité. Cette fraction qui présente 1 à 2 des **hordéines** totales n'est pas une vraie protéine de réserve car elle est souvent mélangée avec des albumines et des globulines (Salcedo *et al.*, 1980).

Les B et C-hordéines semblent être polymorphes. Les profils électrophorétiques et les densitogrammes (Figure 2) des bandes majeures des régions B et C-hordéines obtenues à partir d'un grain et de la farine de la variété correspondante montrent des différences qualitatives et/ou quantitatives entre les variétés étudiées à l'exception des variétés Roho et Taj. Chacune des six variétés analysées présente soit un profil unique, c'est le cas des variétés Martin, Rihane et Roho, soit 2 à 3 profils avec toujours un profil dominant

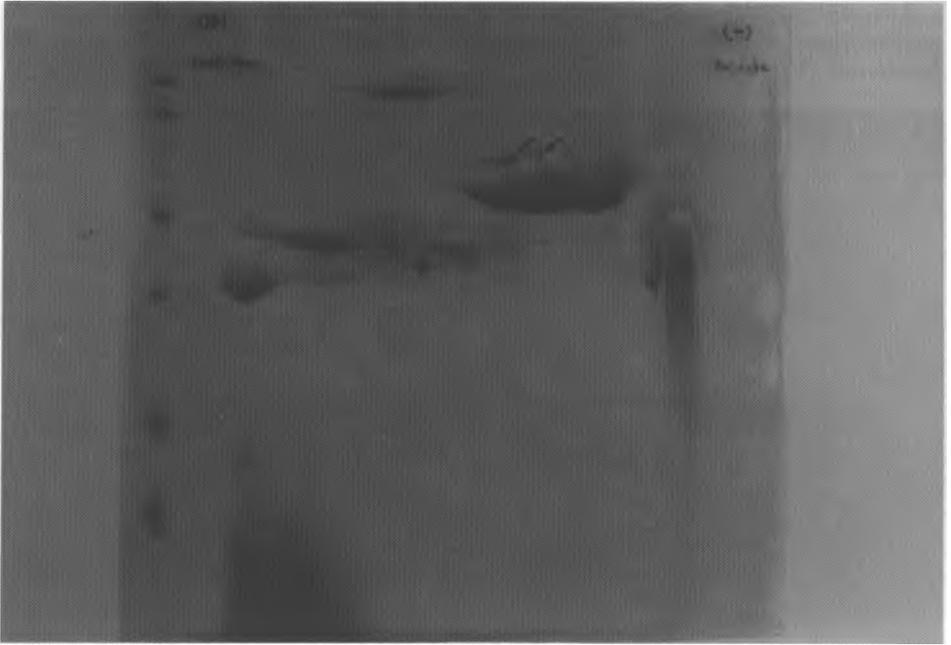


Fig. 2. — IEF/SDS-PAGE des hordéines (Iso-électrophorégramme de la variété Roho).

dont la fréquence peut atteindre jusqu'à 98 %, c'est le cas des variétés **Faiez**, **Taj** et **Cérès**.

Les profils identiques des variétés **Roho** et **Taj** laissent supposer qu'elles ont une même origine génétique et que leur sélection a été faite selon des critères autres que les hordéines.

Les spectres électrophorétiques des hordéines sont le reflet de multiples paramètres (pHi, poids moléculaire, etc...). La possibilité d'envisager une relation entre les caractéristiques de ces protéines et les qualités technologiques permettrait de sélectionner tel ou tel autre type de constituant pour la qualité.

L'utilisation de trois systèmes enzymatiques (les estérases, la glutamate oxalo-acétate transaminase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase), pourtant génétiquement différents des hordéines, n'a pas permis de distinguer la variété **Roho** de la variété **Taj**, ce qui plaide en faveur de l'hypothèse de leur géniteur commun. Ces systèmes, bien qu'ils montrent une certaine différence entre les diverses variétés, ont cependant un pouvoir discriminant plus faible que celui des hordéines. En effet, sur les six variétés étudiées, seule la variété **Faiez** présente un profil caractéristique différent des autres au niveau des trois systèmes étudiés.

Ainsi, il nous a semblé nécessaire de considérer d'autres techniques biochimiques pour une meilleure caractérisation variétale : l'électrophorèse bi-dimensionnelle.

Les résultats obtenus montrent que les hordéines focalisent dans une gamme de pH variant de 5 à 8. Les C-hordéines focalisent principalement entre pH 5 et pH 6,5, alors que les B-hordéines focalisent entre pH 5,5 et 8

(Figure 3). La comparaison des iso-électrophorogrammes des variétés Roho et Taj fait apparaître des différences assez suffisantes pour pouvoir les distinguer.

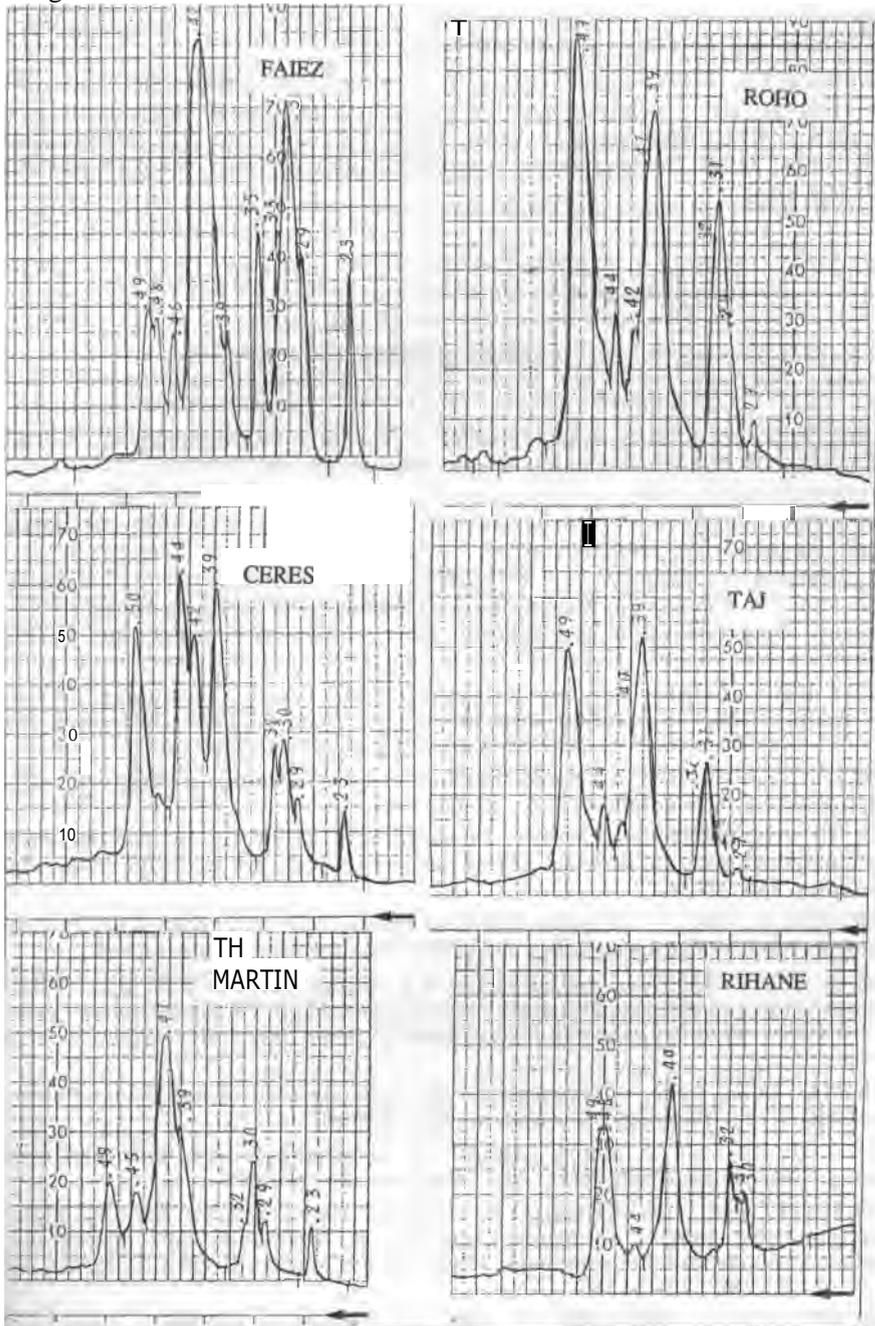


Fig. 3. — Densitogrammes des profils électrophorétiques majeurs des 6 variétés étudiées. Les valeurs au dessus des pics correspondent aux Rf.

Ces résultats montrent que les **hordeïnes** sont plus indiquées que les systèmes enzymatiques pour l'identification **variétale**. Cette étude des protéines de réserve et de quelques systèmes enzymatiques des différentes variétés d'orge permet aussi d'estimer le lien de parenté entre ces variétés en déterminant les distances génétiques entre elles.

Le marquage biochimique basé sur les profils protéiques peut être utile pour effectuer des croisements entre variétés distantes génétiquement. C'est pourquoi, il serait intéressant de créer un fichier contenant l'origine génétique des variétés, leurs caractéristiques agronomiques et leurs diagrammes **électrophorétiques**.

## Bibliographie

- BLAKE T.K., ULLRICH S.E., NILAN R.A., 1982 — Mapping of the **Hor-3** Encoding D **Hordein** in Barley. *Theor. Appl. Genet.*, **63** : 367-371.
- BRADFORD M.M., 1976 — A rapid and sensitive method for the **quantitation** of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72** : 248-256.
- BURBIDGE M.J., BATEY I.L., CAMBELL W.P., SKERRITT J.H., WRIGLEY C.W., 1986 — Distinction between barley varieties by grain characteristics electrophoresis, chromatography and antibody reaction. *Seed Sci. and Techn.*, **14**: 619-629.
- CARDY B.H., STUBER C.W., GOODMAN M.M., 1980 — Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). *Inst. Stat Memograph n° 1317*, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.
- COOKE R.J., 1984 — The characterization and identification of crop cultivar by electrophoresis. *Electrophoresis*, **5** : 59-72.
- DOLL H., ANDERSEN B., 1981 — Preparation of barley storage protein **hordeïn** for analytical sodium **dodecyl sulfate polyacrylamide** gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **115**: 61-66.
- JOURDIER P., 1985 — Le polymorphisme biochimique et l'hérédité des protéines végétales. In *Protéines Végétales*, B. GORDON, Lavoisier, Paris : 25-63.
- KOIE B., INGVERSEN J., ANDERSEN A.J., DOLL H., EGGUM B.O., 1976 — **Composition** and nutritional quality of barley protein. In *Evaluation of seed protein alteration by mutation breeding*. International Agency for Atomic Energy, Vienna : 55-61.
- LAEMMLI U.K., 1970 — Cleavage of structural protein during the assembly of the head of **bacteriophage** T4. *Nature*, **227** : 681-685.
- LANE L.C., 1987 — A simple method for stabilizing protein **sulphydryl** group during SDS gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **86** : 655-664.
- MARCHYLO B.A., LABERGE D.E., 1980 — Barley cultivar identification by **electrophoretic** analysis of **hordein** proteins. 1. Extraction and separation of **hordein** proteins and environmental effects on the **hordein electrophoregram**. *Can. J. Plant. Sci.*, **60**: 1343-1350.
- MARCHYLO B.A., KRUGER J.E., 1985 — Assessment **RP-HPLC** Columns to separate **hordein** proteins and identify cultivars of barley and barley malt. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **43**: 29-35.

- MONTMBAULT A., AUTRAN J.C., JOURDIER P., 1983 — Varietal identification of barley and malt. *J. Inst. of Brewing*, 89 (4) : 299-303.
- O'FARREL Ph., 1975 — High resolution two dimensional electrophoresis of protein. *J. Biol. Chim.*, 250: 4007-4021.
- SALCEDO G., SANCHEZ-MONGE R., ARGAMENTERIA A., ARAGONCILLO C., 1980 — The A-Hordeins as a group of salt soluble hydrophobic proteins. *Plant Sci. Lett.*, **19**: 109-119.
- SANDMEIER M., BENINGA M., PERNÈS J., 1981 — Analyse des relations entre formes spontanées et cultivées chez le mil à chandelles. III. Etude de l'hérédité des estérases et des peroxydases. *Agronomie*, **1**: 487-494.
- SCANDALIOS J.G., 1969 — Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. *Biochem. Genet.*, **3**: 37-79.
- SHEWRY P.R., ELLIS J.R.S., PRATT H.M., MIFLIN B.J., 1978 — Comparison of methods for the extraction and separation of hordein fraction from 29 barley varieties. *J. Sei. Fd. Agric.*, **29**: 433-441.
- SHEWRY P.R., MIFLIN B.J., 1985 Seed storage proteins of economically important cereals. In *Advances in cereal science and technology* vol.7 : 1-84 — Y. Pomeranz (ed), Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, Minnesota.
- STUBER C.W., GOODMAN M.M., JOHNSON F.M., 1977 Genetic control and rational variation of  $\beta$ -glucosidase isozymes in maize (*Zea mays* L.). *Bioch. Genet.*, **15** : 383-394.
- TRIGUI N., SANDMEIER M., SALANOUBAT M., PERNÈS J., 1986 — Utilisations des données enzymatiques et morphologiques pour l'étude des populations et de la domestication des plantes. I. Séparation et identification génétique d'isozymes chez le Mil (*Pennisetum typhoides*). *Agronomie*, **6** (9) : 779-788.
- WEBER K., OSBORN M., 1969 — The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244** : 4406-4412.
- WRIGLY C.N., AUTRAN J.C., BUSHUK W., 1982 Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain protein. In *Advances in cereal science and technology* vol. 5: 211-259 — Y. Pomeranz (ed), Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, Minnesota.

# Contribution au développement et à l'utilisation des cartes génétiques moléculaires en génétique des riz

Gérard SECOND \*, Alain GHESQUIERE \*\*, Mathilde CAUSSE \*\*\*  
et Olivier PANAUD \*\*\*\*

*Résumé:* L'étude du polymorphisme au niveau de l'ADN (RFLP, RAPD...) permet d'établir des cartes génétiques saturées. Dans cet objectif, des considérations sur la phylogénie des riz nous ont conduit à proposer un croisement interspécifique dont la cartographie est en cours d'achèvement (Cornell University). Sur le plan des ressources génétiques, l'utilisation d'une carte génétique saturée doit permettre une meilleure estimation de l'importance et de la structure de la diversité génétique, ainsi que des flux géniques à travers les barrières reproductives. L'analyse de cette diversité permet d'envisager en particulier une rationalisation de l'utilisation des ressources génétiques en privilégiant la diversité allélique: les collections pourraient ainsi se limiter à un plus petit nombre de géniteurs mais potentiellement plus riches de transgressions favorables dans les hybridations; d'autre part, les tendances génétiques consécutives au processus de domestication et à la sélection moderne pourront être décelées au niveau génotypique.

Parallèlement à l'identification et à la localisation des gènes d'intérêt agronomique, les marqueurs moléculaires offrent la possibilité de contrôler et de suivre les introgressions dans les descendances issues d'hybridations interspécifiques; cette démarche est abordée non seulement dans les croisements éloignés à l'intérieur du groupe *Sativa* (génome A) mais également dans des combinaisons mettant en jeu d'autres génomes. La cartographie de la diversité génétique résultante permettra de tester la valeur adaptative de certains fragments chromosomiques chez les riz sauvages et cultivés. Le point sera fait sur les développements récents des marqueurs moléculaires chez le riz à travers le programme d'évaluation de la diversité mené à l'IRRI (Philippines) et des exemples de suivi d'introgression en cours d'analyse.

*Mots-clés:* riz, marqueurs moléculaires, cartes génétiques, ressources génétiques, hybridation.

\* IRRI, Plant Breeding Genetics and Biochemistry Division, PO Box 933, Manila, Philippines.

\*\* ORSTOM, Laboratoire de Génétique et d'Amélioration des Plantes Tropicales, BP 5045, 34032 Montpellier cedex, France.

\*\*\* INRA, Station de Génétique Végétale, Ferme du Moulon, 91190 Gif/Yvette, France.

\*\*\*\* Laboratoire d'Evolution et Systématique des Végétaux, CNRS (URA 121), Bât 362, Université Paris-Sud XI, 91405 Orsay cedex, France.

*Abstract* : The study of polymorphism at DNA level (RFLP, RAPD...) allows to establish saturated genetic maps. In this aim, considerations on rice phylogenetic relationships led us to propose an interspecific back cross population for which mapping is expected to be completed in the near future (Cornell University). From the genetic resources standpoint, the development of a saturated rice map is expected to improve the evaluation of the range and structure of genetic diversity, as well as of gene flows across reproductive barriers. The analysis of this diversity will permit to rationalize the utilization of genetic resources while emphasizing on allelic diversity : thus, collections could be reduced to a smaller number of selected genitors but more suitable to lead to new genetic transgressions in hybridization programs. Also, genetic trends resulting from domestication process and modern plant breeding will be evidenced at genotypic level.

Jointly with tagging agronomic genes, molecular markers enable monitoring of genetic introgressions in progenies of interspecific hybrids. This is being done both in remote crosses within multispecific *Sativa* group (A genome) and in hybrids involving others genomes. Mapping of genetic diversity in hybrid derivatives will allow testing the adaptive value of peculiar chromosome fragments in wild and cultivated rice. The present status of rice molecular markers will be presented through the program of genetic diversity evaluation program underway at IRRI (Philippines) and examples of monitoring introgression for which analysis are pursued.

*Key words* : rice, molecular markers, genetic map, genetic resources, hybridization.

## Introduction

Parmi les plantes cultivées et surtout les céréales, le riz présente un ensemble de caractéristiques qui le rendent particulièrement apte à la caractérisation moléculaire de son génome. En dehors de son importance géopolitique et économique dans le monde, la principale de ces caractéristiques est la petite taille de son génome : en nombre de nucléotides, cette taille (C = 450 Mb) est seulement environ trois fois celle d'*Arabidopsis thaliana*, mais elle est inférieure de deux fois environ à celle de la tomate, cinq fois à celle du maïs, onze fois à celle de l'orge et près de quarante fois à celle du blé tendre (Arumuganathan et Earle, 1991). Comme on peut l'attendre d'un petit génome, celui du riz contient une proportion élevée de séquences uniques que l'on estime à 75 % (Deshpande and Ranjekar, 1980 ; Mc Couch *et al.*, 1988) ; en outre, de toutes les graminées testées, le riz s'est révélé être la plus facile à transformer par de l'ADN exogène.

Conjointement au développement des biotechnologies, des progrès rapides ont été fait depuis quelques années dans l'étude et la manipulation du génome des riz : le génome chloroplastique du riz a d'ores et déjà été séquencé entièrement (Hiratsuka *et al.*, 1989), une carte physique de celui de la mitochondrie du riz est en cours (André *et al.*, 1991) et le projet de séquencer entièrement le génome nucléaire du riz est sérieusement envisagé, notamment au Japon.

Notre contribution s'est limitée au domaine du développement de cartes génétiques moléculaires et de leur utilisation dans l'évaluation de la diversité des ressources génétiques et dans leur appui à l'amélioration variétale par croisements. Cette contribution apparaît comme une suite logique du programme de recherche sur les riz africains mis en place par Jean Pernès : nous privilégierons donc ici les aspects qui découlent directement de la compréhension de l'organisation et de la structure de la diversité génétique des riz sauvages et cultivés tout en les situant dans leur contexte plus général.

## Développement des cartes de liaison génétique des marqueurs RFLP

Le développement des cartes de liaisons génétiques chez le riz s'est fait depuis de nombreuses années sur la base de marqueurs morphologiques (Kinoshita, 1984) et plus récemment à partir de marqueurs isozymiques (Wu *et al.*, 1988 ; Pham *et al.*, 1990). La mise en évidence et la localisation de nouveaux marqueurs isozymiques est poursuivie à l'IRRI et concerne actuellement 35 marqueurs cartographiés sur 10 chromosomes (Khush *et al.*, 1991). Loin d'être obsolètes, ces premières cartes conserveront un grand intérêt lorsqu'elles auront été intégrées aux cartes de marqueurs de l'ADN, plus complètes et d'application plus universelle ; en particulier, elles peuvent être suffisantes pour des études préliminaires de liaisons génétiques au moindre coût. Néanmoins, seuls les marqueurs au niveau de l'ADN et plus particulièrement les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ont permis à ce jour l'élaboration de cartes « saturées » où la distance moyenne entre marqueurs est de 5 cM ou moins.

Depuis la première carte RFLP partielle publiée sur le riz (Mc Couch *et al.*, 1988), plusieurs autres sont en développement, dont seules deux sont saturées avec 12 groupes de liaison (Yano *et al.*, 1991 ; Tanksley *et al.*, 1991 ; Causse et Tanksley, ce volume). La première carte ainsi que celle entreprise par l'équipe japonaise ont été toutes deux développées à partir de croisements entre des variétés cultivées appartenant aux sous-espèces japonica et indica car ces croisements présentent un polymorphisme plus important comparativement aux combinaisons intragroupes. La carte développée par Mc Couch *et al.* (1988) montre, pour un total de 135 marqueurs cartographiés, 22 groupes de liaisons ainsi que des marqueurs isolés qui n'ont pu être regroupés sur les 12 chromosomes du riz que grâce à l'utilisation d'une série complète de trisomiques (Khush *et al.*, 1984). L'addition de 100 nouveaux marqueurs (Mc Couch et Tanksley, 1991) n'a pas permis de réduire sensiblement le nombre de groupes de liaison dans ce croisement et il n'est pas évident qu'un autre croisement parmi des variétés d'*O. saliva* puisse être plus satisfaisant de ce point de vue sauf en utilisant un nombre de plantes F2 beaucoup plus important.

La distribution des marqueurs RFLP sur la carte génétique du riz soulève un problème intéressant car, comme le montre aussi la carte RFLP de la tomate, avec plus de 1 000 marqueurs, il existe des groupes de marqueurs en liaison étroite (« Linkats »), par rapport à des zones de recombinaisons plus élevées qui apparaissent sans marqueurs (Tanksley, 1991). Seule la

comparaison des cartes génétiques et physiques permettra de vérifier cette variation présumée des taux de recombinaison génétique le long des chromosomes ; néanmoins, chez le riz, nous pouvons aussi prédire qu'un autre facteur se surajoute pour rendre compte de l'irrégularité des marqueurs sur les chromosomes. En effet, comme nous l'avons vu (Charrier et Second, ce volume), la structure de la diversité génétique d'*O. sativa* est liée à une domestication indépendante des sous espèces *indica* et *japonica* à partir d'ancêtres sauvages suivie d'**introgressions** réciproques de segments chromosomiques entre ces variétés ancestrales. On doit donc s'attendre à ce que la divergence de deux variétés cultivées soit variable le long des chromosomes, selon que les segments chromosomiques considérés ont des ancêtres sauvages différents ou au contraire ont un ancêtre commun depuis la domestication à la suite des **introgressions** réciproques. Si cela est vrai, la distribution des marqueurs polymorphes (c'est-à-dire les seuls qui peuvent être potentiellement cartographiés) sera variable le long des chromosomes. L'existence de ces cartes permettra sous peu de vérifier cette hypothèse.

C'est sur la base de ces considérations que nous avons proposé de poursuivre le développement de la carte génétique du riz à partir d'un croisement entre riz sauvage et cultivé. Nous avons sélectionné une population issue d'un back cross **interspécifique** (*O. sativa* x *O. longistaminata*) x *O. sativa* pour les raisons suivantes :

—les études cytogénétiques montrent une méiose normale chez les hybrides **interspécifiques** *O. sativa* x *O. longistaminata* (génome A du groupe **multispécifique** *Sativa*) (Nayar, 1973).

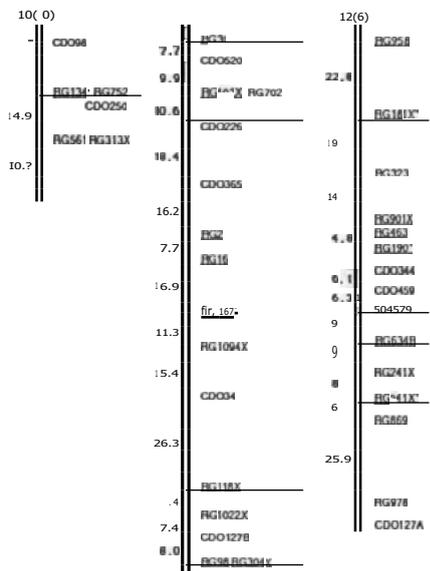
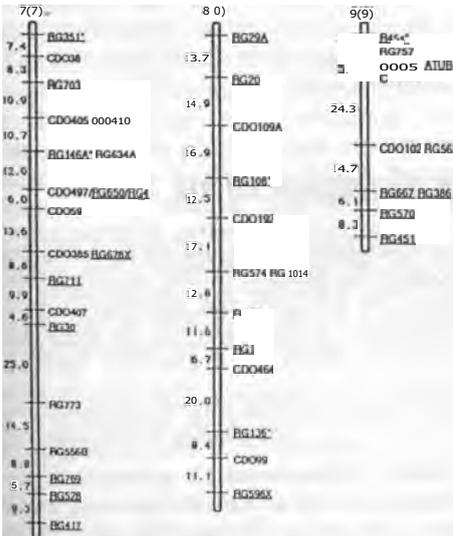
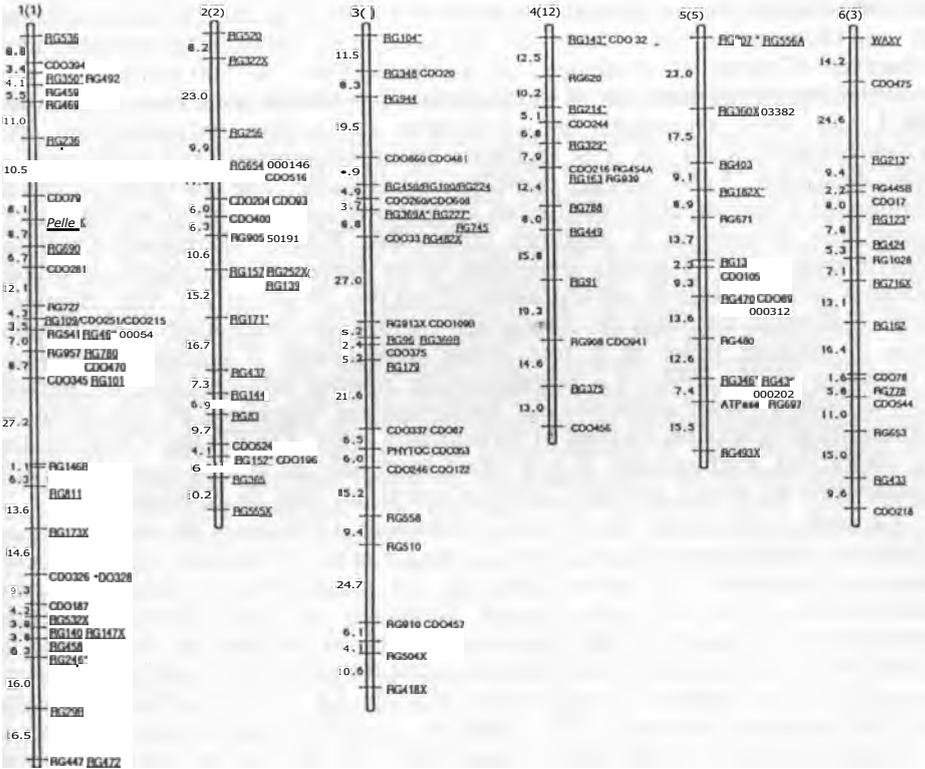
—les études de ségrégation de 9 marqueurs **isozymiques** dans les back cross **interspécifiques** montrent des ségrégations régulières malgré la stérilité pollinique très forte de ces hybrides (Ghesquière, 1988).

—le taux de polymorphisme attendu est très élevé compte tenu de la distance génétique élevée séparant les deux espèces (Second, 1985).

—la pérennité d'*O. longistaminata* permet de compter sur une conservation végétative plus facile de la population back cross cartographiée.

Cent dix huit plantes **BC1** ont été retenues et ont servi dans un premier temps à transférer 100 marqueurs de la carte de Mc Couch *et al.* (1988) ; ensuite, une librairie de **cDNA** d'avoine a été utilisée pour porter la carte à plus de 200 marqueurs sur 12 groupes de liaison (Figure 1) (Causse et Tanksley, ce volume). Comparativement à la première carte, les distorsions

Fig. 1. Carte génétique du riz établi sur un back cross **interspécifique** (*O. sativa* x *O. longistaminata*) x *O. sativa* (Causse et Tanksley, ce volume). La numérotation des chromosomes suit la nouvelle nomenclature adoptée à l'IRRI en mai 1990 et l'ancienne identification définie par Khush *et al.* (1984) est indiquée entre parenthèses. Plus de 200 marqueurs sont placés sur 12 groupes de liaisons correspondant aux 12 chromosomes de riz avec l'identification suivante : **RG** indique les marqueurs d'une banque **génomique** de riz et **CDO** les marqueurs d'une librairie de **cDNA** d'avoine. Les sondes qui hybrident avec 2 bandes majeures ou plus sont signalées par X si un seul locus a été cartographié ou par A et B si 2 loci ont été cartographiés. Les marqueurs communs entre cette carte et la première carte développée par Mc Couch *et al.* (1988) sont soulignés et une astérisque indique les marqueurs placés sur leurs chromosomes grâce aux trisomiques. Cinq gènes identifiés ont été placés sur cette carte : waxy, phytochrome (**phytoe**), atubuline (**atub**), ATPase, **r45s**. La distance entre les marqueurs est indiquée en centimorgan sur la gauche des chromosomes et les marqueurs dont la position n'a pas une probabilité supérieure à 99 % sont placés à côté du marqueur le plus proche. La cartographie de cette population back cross se poursuit et fait appel à la technique des **RAPD** pour combler les segments sans marqueurs lorsqu'ils dépassent 5 cM avec pour objectif de publier cette carte dès qu'elle atteindra 500 marqueurs (Causse *et al.*, en préparation).



de ségrégations n'étaient pas plus importantes et la plupart des marqueurs se retrouvaient sur les mêmes chromosomes avec la même disposition, même si une diminution assez forte des distances (25 %) entre marqueurs était observée (Causse et Tanksley, ce volume). Près de 500 marqueurs sont maintenant positionnés sur la carte génétique obtenue avec cette population BC 1 ; ils sont regroupés en 12 groupes de liaison correspondant aux 12 chromosomes du riz. Les segments de chromosomes sans marqueurs et qui dépassent 5 cM seront comblés en utilisant une méthode nouvelle consistant à regrouper les plantes en ségrégation qui présentent les marqueurs parentaux encadrant le segment cible ; des RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) seront recherchés alors entre ces marqueurs et utilisés comme sondes pour la cartographie (Tanksley *et al.*, 1991). Les télomères sont également en cours de cartographie grâce aux techniques d'électrophorèse en champ pulsé et à une sonde télomérique d'*Arabidopsis thaliana* (Tanksley *et al.*, 1991). La population de plantes rétrocroisées, les parents et l'hybride FI sont préservés par multiplication végétative en quatre points différents (Universités Cornell et Athens aux USA, ORSTOM à Montpellier et IRRI aux Philippines). Il y a donc tout lieu de penser que cette carte conservera au moins pendant quelque temps un rôle de référence.

La seule autre carte du riz avec seulement 12 groupes de liaison est en cours de développement au Japon, à partir d'un croisement entre variétés *indica* et *japonica* d'*O. sativa*. Soixante-dix sondes ont été échangées réciproquement entre les deux équipes (Tanksley et Saito, comm. pers.) et permettront l'alignement des deux cartes tout en augmentant le nombre de marqueurs sur chacune. Par ailleurs, la carte du riz cultivé a été partiellement transférée aux espèces *O. officinalis* (génome CC) et *O. latifolia* (génome CCDD) (Jena et Kochert, 1991 ; Jena *et al.*, 1991 ; Kochert, comm. pers.).

L'apport de la cytogénétique sera également déterminant dans l'établissement des cartes : un ensemble de 14 trisomiques secondaires représentant les 12 chromosomes de riz a été isolé à partir de la série de trisomiques primaires établie par Khush *et al.* (1984) ; ces trisomiques secondaires ont le stock chromosomique normal plus un iso-chromosome supplémentaire, ils seront d'une grande utilité pour orienter les groupes de linkage et placer les centromères sur la carte génétique RFLP (Khush *et al.*, 1991).

## Utilisation des cartes génétiques du riz

Parmi les utilisations potentielles des cartes génétiques, on peut distinguer d'une part le marquage sur les chromosomes des gènes d'intérêt agronomique avec pour objectif le clonage de ces gènes ou l'emploi des marqueurs pour faciliter et accélérer le transfert des caractères utiles dans les programmes de sélection après croisement (Tanksley *et al.*, 1988). Ce travail est basé sur l'utilisation de lignées isogéniques et a déjà été entrepris avec succès pour plusieurs gènes : on peut citer comme exemple un gène de sensibilité à la photopériode (Mackill *et al.*, 1990), des gènes de résistance à la pyriculariose (Yu *et al.*, 1991), ainsi qu'à une bactériose (*Xanthomonas oryzae* — gène Xa21) pour lequel une marche sur le chromosome a été entreprise à partir d'une banque de chromosomes artificiels de levure (Ronald *et al.*, 1991). D'autre part les marqueurs moléculaires peuvent être aussi d'un grand intérêt pour caractériser les ressources génétiques et aborder le niveau

moléculaire de la diversité **allélique** des caractères agronomiques. Nous nous limiterons aux aspects qui concernent directement l'utilisation et l'évaluation des ressources génétiques.

### Les marqueurs cartographiés et l'évaluation de la diversité génétique

Plus important que de permettre une égale distribution sur le génome des marqueurs analysés (ce que l'on peut assurer en utilisant un grand nombre de marqueurs), l'utilisation de marqueurs cartographiés doit théoriquement permettre la mise en évidence directe des **introgressions**. Or, nous avons vu (Charrier et Second, ce volume) l'importance des hybridations **introgressives** dans l'évolution des riz sauvages et cultivés. C'est dans cette optique que l'un de nous poursuit la caractérisation d'une collection de riz cultivés à l'Institut International de Recherche sur le Riz (IRRI) aux Philippines. Un total de 600 variétés a été sélectionné : pour moitié, elles représentent une collection mondiale de variétés traditionnelles choisies par J.C. Glaszmann et M. Bonman sur la base de leur classification en groupes **isoenzymatiques** (Glaszmann, 1987) et de leur origine géographique et **agro-écologique** diverse ; ces variétés sont en cours de caractérisation au champ pour leur comportement agronomique, leur résistance aux parasites ainsi qu'à différents stress biotiques et abiotiques. L'autre moitié de cet échantillonnage représente des variétés d'intérêt particulier pour les sélectionneurs : variétés les plus performantes cultivées sur de grandes surfaces dans chaque type d'écosystème, variétés élites issues des programmes de sélection ou encore sources bien identifiées de résistance ou de caractéristiques particulières (qualité de grain, etc...). Le pedigree d'un bon nombre de ces variétés améliorées est connu, et certaines d'entre elles sont issues de croisements entre sous-espèces *indica* et *japonica*. Environ 50 marqueurs (**isozymes**, **RFLP**, **RAPD**) seront caractérisés sur l'ensemble de ces 600 variétés pour aboutir après élimination des accessions redondantes à un sous-ensemble représentatif d'une centaine de variétés. Deux cents marqueurs comportant des marqueurs **RFLP** cartographiés, des séquences répétées, ainsi que des marqueurs **chloroplastiques** et **mitochondriaux** seront ensuite analysés.

Cette étude devrait donner une vue d'ensemble de la diversité génétique des riz cultivés et mettre en évidence les effets génétiques qui ont accompagné la domestication et la sélection moderne. Si ces effets sont réellement importants, les phénomènes **introgressifs** entre sous-espèces *indica* et *japonica* pourront être mis en évidence beaucoup plus clairement et permettre une classification encore plus précise des variétés de riz cultivés. Un autre retentissement attendu du point de vue ressources génétiques sera de permettre une réduction significative du nombre d'accessions conservées tout en garantissant une diversité génétique élevée. Une approche similaire est également entreprise pour la caractérisation des riz sauvages et l'étude des relations phylogénétiques des espèces du genre *Oryza*.

### La cartographie des gènes d'intérêt agronomique en relation avec l'évaluation des ressources génétiques

L'évaluation de la diversité génétique au travers des marqueurs moléculaires présente la limitation inhérente à l'étude de marqueurs généralement **adaptativement** neutres alors que l'on cherche à évaluer la diversité intéressante sur le plan agronomique. Il y a tout lieu de penser qu'une corrélation étroite existe sur le plan quantitatif entre les deux types de diversité, neutre

et adaptative (les marqueurs moléculaires traçant la **phylogénie** au cours de laquelle les gènes d'intérêt agronomique ont été sélectionnés dans des milieux différents), néanmoins, on peut envisager certaines situations où l'estimation du polymorphisme neutre peut ne pas renseigner valablement sur le polymorphisme d'intérêt agronomique :

Une espèce **allogame** comme *O. longistaminata* qui peut développer des peuplements très importants est susceptible de montrer un polymorphisme neutre élevé (effectif **efficace** élevé pendant de nombreuses générations) ; celui-ci est effectivement vérifié sur le plan marqueurs moléculaires (Ghesquière, 1988 ; Leblanc *et al.*, ce volume) mais on sait par ailleurs que cette espèce ne montre pas une forte variabilité **intraspécifique** sur le plan **agromorphologique**. Il peut également s'agir d'une **difficulté** à évaluer **agronomiquement** les espèces sauvages **allogames** par rapport aux espèces **autogames**.

Au contraire, chez une espèce **autogame** et à plus forte raison si elle a été domestiquée, le faible taux efficace de reproduction peut être compensé par l'effet direct de la sélection de mutations favorables au cours de la domestication, ou de l'amélioration.

La possibilité de pouvoir analyser la diversité **allélique** de gènes d'intérêt agronomique cartographiés, ou encore mieux clonés, devrait permettre d'avancer significativement dans ce domaine. On peut se référer par exemple au travail effectué sur l'amplification d'un gène de résistance aux insecticides chez le moustique qui montre que, quelle que soit l'origine géographique des moustiques sur plusieurs continents, ils présentent le même gène amplifié alors que les séquences environnantes sont diversifiées (Raymond, 1991). L'analyse des gènes de photopériodisme chez le riz, en cours à l'**IRRI** devrait être instructive à ce sujet. L'analyse de la variabilité moléculaire des parasites à relier avec leur pouvoir pathogène permettra également d'aborder sur le plan moléculaire les relations hôtes-parasites (diversité génétique chez Une plante hôte d'une résistance donnée).

Un autre modèle intéressant sera le décryptage du déterminisme des caractères qui sont particuliers à certaines variétés cultivées et qui n'existent pas chez les riz sauvages, telles que les caractéristiques de taille et qualité des grains, ou encore celles du système **racinaire**, particulièrement développé chez les riz pluviaux africains par exemple. Le déterminisme de ces caractères peut être lié à une ou des mutations (c'est sans aucun doute le cas du caractère gluant waxy du grain), mais aussi à des transgressions génétiques liées à des combinaisons originales entre gènes provenant d'espèces ou sous-espèces différentes. A ce point de vue, plusieurs croisements en cours d'étude à l'**IRRI** **permettent** de confirmer que des transgressions génétiques, comme elles ont été suggérées par Arrauudeau (1975), sont fréquentes dans les recombinaisons entre variétés *indica* et *japonica*. Ces croisements concernent des lignées obtenues au bout de 6 générations SSD (Single Seed Descent) ou des lignées haploïdes doublées obtenues dans des croisements entre variétés *indica* et *japonica* (Mc Couch *et al.*, 1989) et pour lesquelles l'analyse au niveau des marqueurs **RFLP** a été entreprise.

### **Caractérisation des **introgressions** dans les croisements éloignés**

Les marqueurs **RFLP** donnent également les moyens de suivre les **introgressions** dans les descendances issues d'hybridations éloignées qui mettent en jeu des espèces sauvages possédant d'autres génomes (génomes B, C, BC,

CD, E et F tels qu'ils ont été définis au niveau des appariements chromosomiques ; Nayar, 1973). Un programme de croisements entre le riz cultivé, *O. sativa* (génome A), et ces espèces sauvages éloignées incluant des espèces tétraploïdes a été entrepris à l'IRRI (Brar *et al.*, 1991). Ces espèces font l'objet d'un grand intérêt d'une part parce qu'elles constituent des sources de gènes de résistance à des parasites et d'autre part parce que les techniques de sauvetage d'embryons par culture *in vitro* sont maintenant bien maîtrisées et permettent d'obtenir des hybrides interspécifiques qui peuvent être ensuite recroisés.

### Croisements entre génomes

Deux cas d'hybridations entre génomes cytogénétiquement différents ont pour l'instant été caractérisés au niveau moléculaire : les introgressions à partir d'*O. officinalis* (génome C) et celles à partir d'*O. brachyantha* (génome F) ; les croisements avec *O. officinalis* ont été motivés principalement par la recherche de résistance à une cicadèle (*Nilaparvata lugens*) vectrice d'un virus (Tungro) ; des croisements ont été réalisés entre 2 lignées d'*O. sativa* et 5 souches d'*O. officinalis*. Cinquante deux lignées d'introgressions à 24 chromosomes (BC2F8) ont été analysées pour 174 marqueurs RFLP couvrant tous les chromosomes et approximativement tous les 10 cM (Jena *et al.*, 1991) ; 28 segments de chromosomes d'*O. officinalis* ont été identifiés dans une ou plus de ces lignées et concernent 11 des 12 chromosomes ; ces fragments introgressés ne portent qu'un marqueur, suggérant leur petite taille mais ne semblent pas être plus petit comparativement aux plantes de la génération BC2F3 ; la grande dispersion et la petite taille des fragments d'introgressions semblent difficilement compatibles avec les possibilités d'observation des appariements chromosomiques au cours de la méiose F ; aussi, Jena *et al.* (1991) concluent qu'un mécanisme autre que le crossing over doit être à l'origine de ces introgressions à moins que la fréquence des appariements ne représente pas valablement la fréquence des recombinaisons génétiques.

D'une manière différente, l'analyse RFLP des introgressions avec *O. brachyantha* a concerné directement la seconde génération de recroisement avant toute sélection pour le caractère cible et l'aspect agronomique des plantes. Cette étude a été couplée à une analyse cytogénétique du matériel et 16 plantes BC2 possédant de 25 à 30 chromosomes ont été étudiées pour 34 marqueurs RFLP (Panaud, ce volume) : de nombreux fragments caractéristiques d'*O. brachyantha* sont mis en évidence même en excluant les situations aneuploïdes à  $2n + 1$  chromosomes ; ces fragments sont observés parmi toutes les plantes et concernent tous les chromosomes, leur apparition peut être interprétée par des modèles de crossing over simples ou doubles entre les chromosomes des génomes A et F (Panaud, ce volume). Comme dans l'exemple précédent, ces résultats semblent contradictoires avec les possibilités d'appariements à la méiose ; néanmoins, Panaud *et al.* (1992) suggèrent que le déroulement de la méiose pourrait être différent dans ces hybrides F1 et nécessiterait des observations à un stade plus précoce (pachytène) pour mettre réellement en évidence les possibilités de recombinaisons. La création d'une série complète de lignée d'addition à partir d'*O. brachyantha* est en cours et les recroisements sont poursuivis pour évaluer le matériel vis-à-vis d'une résistance à des lépidoptères foreurs des tiges de riz.

*Hybridations interspécifiques avec O. longistaminata*

Bien qu'au sein du même groupe *multispécifique Sativa* (génome A), les hybridations entre *O. sativa* et *O. longistaminata* s'apparentent à des croisements éloignés : distance génétique très grande et forte barrière reproductive nécessitant pratiquement toujours la culture des embryons pour obtenir les hybrides F1.

La variabilité moléculaire d'*O. longistaminata* représente sur le plan quantitatif l'équivalent de celle des formes asiatiques d'*O. rufipogon* et donc un réservoir potentiel de variabilité d'autant plus intéressant que cette espèce n'a pas été concernée par la domestication du riz en Afrique (Ghesquière, 1988). Alors que l'on sait que les *introgressions* avec les espèces sauvages ont été déterminantes dans l'origine de la diversité génétique du riz cultivé asiatique (Second, 1982), le fonctionnement de ces *introgressions* à partir d'*O. longistaminata* est resté très limité sur le continent africain ; ceci peut être expliqué par la liaison stricte entre le gène de barrière reproductive présent chez *O. longistaminata* et ceux gouvernant l'expression des rhizomes ; cette liaison a pour effet de limiter fortement les possibilités de développement de populations adventices qui pourraient être une source de flux de gènes vers les riz cultivés (Ghesquière, 1990). Au niveau de la variabilité d'intérêt agronomique de cette espèce, peu de choses ont encore été exploitées pour l'instant : on peut citer le transfert des caractères d'*allogamie* sur des lignées mâles stériles pour améliorer la production de semences hybrides (Taillebois et Guimaraes, 1987) et plus récemment le transfert d'un gène de résistance à large spectre (Xa21) vis-à-vis de plusieurs souches de *Xanthomonas oryzae* (Khush *et al.*, 1990). D'autre part, les hybridations *interspécifiques* entre *O. sativa* et les espèces possédant d'autres génomes nécessitent encore la culture des embryons pour obtenir les premières générations de *recroisements* ; au contraire, les phénomènes de barrières reproductives et de stérilité dans les *recroisements* issus des hybridations avec *O. longistaminata* sont nettement moins prononcés et permettent d'envisager une utilisation plus complète de la diversité génétique de ce pool secondaire ; c'est ainsi que des populations artificielles issues de back cross *interspécifiques* sur *O. sativa* peuvent être créées et permettre des brassages génétiques importants à l'origine d'une nouvelle variabilité (Cause et Ghesquière, 1990).

Le modèle représenté par *O. longistaminata* et l'existence de cartes de marqueurs permet d'envisager de manière plus réaliste l'accès à une diversité génétique large et de tester le concept de ressources génétiques qui ne seraient pas limitées seulement au transfert de caractères agronomiques directement évaluables. Dans cet objectif, 13 souches d'*O. longistaminata* représentatives de la variabilité *écogéographique* de cette espèce et impliquées dans des *recroisements interspécifiques* ont été étudiées pour leur variabilité RFLP sur 39 sondes. Un polymorphisme très important est observé parmi toutes ces souches et met en évidence pour 29 de ces sondes des marqueurs diagnostiques de la lignée d'*O. sativa* entrant dans la composition de l'hybride F1 utilisé (Leblanc *et al.*, ce volume). Une population BC1F2 a été mise en place et constitue un matériel largement diversifié en recombinaisons provenant d'*O. longistaminata* ; cette population fournit un matériel de choix pour étudier les recombinaisons entre les deux espèces et rechercher des marqueurs de l'expression des rhizomes.

## Bibliographie

- ANDRÉ C.P., NARAYANAN K.K. and V. WALBOT, 1991 — Pulsed field gel analysis of rice mitochondrial genomes. Molecular mapping of the rice genome. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona. USA. October 2-5 1991. Abstracts : p 149.
- ARRAUDEAU M., 1975 — Réflexions sur le choix des géniteurs et sur certaines voies d'obtention de variétés nouvelles chez le riz (*O. saliva* L.). *Agron. Trop.*, 30 (1) : 8-18.
- ARUMUGANATHAN K. and E.D. EARLE, 1991 — Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 9 (3) : 208-218.
- BRAR D.S., KHUSH G.S., MULTANI D.S., DALMACIO R., ELLORAN R., DE LOS REYES B., PANAUD O., VIRTUCIO J. and L.A. SITCH, 1991 — Wide hybridization and alien gene transfer in rice. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona. USA. October 2-5 1991. Abstracts : p 100-101.
- CAUSSE M. and A. GHESQUIÈRE, 1990 — Prospective use of *Oryza longistaminata* for rice breeding. In Proc. 2nd Intern. Rice Genet. Symp. IRRI, Los Banos, Philippines. may 14-18, 1990. (in press).
- DESHPANDE V.G. and P.K. RANJEKAR, 1980 — Repetitive DNA in three Gramineae species with low DNA content. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361 (8) : 1223-1233.
- GHESQUIÈRE A., 1988 — Diversité de l'espèce sauvage de riz, *Oryza longistaminata* A. Chev. & Roehr et dynamique des flux géniques au sein du groupe *Sativa*. Thèse Doct. ès-Sciences, Univ. Paris-Sud, Orsay. 228 pp.
- GHESQUIÈRE A., 1990 — Reexamination of the genetic control of the reproductive barrier between *Oryza longistaminata* and *O. sativa* and relationship with the rhizome expression. In Proc. 2nd Intern. Rice Genet. Symp. IRRI, Los Banos, Philippines. may 14-18, 1990 (in press).
- GLAZSMANN J.C., 1987 — Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.*, 74: 21-30.
- HIRAI A., IWASHASHI M., SUGINO K., KANNO A. and T. ISHIBASHI, 1990 — Structure of cytoplasmic genomes in rice. In Proc. 2nd Intern. Rice Genet. Symp. IRRI, Los Banos, Philippines. may 14-18, 1990. (in press).
- HIRATSUKA J., SHIMADA H., WHITTIER R., ISHIBASHI T., SAKAMOTO M., MORI M., KONDO C., HONJI Y., SUN C.R., MENG B.Y., LIY O., KANNO A., NISHIWASA Y., HIRAI A., SHINOZAKI K., SUGIURA M., 1989 — The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome : intermolecular recombination between tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.*, 217: 185-194.
- JENA K.K. and G. KOCHERT, 1991 — Restriction fragment length polymorphism analysis of CCDD genome species of the genus *Oryza* L. *Plant. Mol. Biol.*, 16: 831-839.
- JENA K.K., KHUSH G.S. and G. KOCHERT, 1991 RFLP analysis of rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines. *Theor. Appl. Genet.*, (Submitted).
- KHUSH G.S., SINGH R.J., SUR S.C. and A.L. LIBROJO, 1984 — Primary trisomics of rice : origin, morphology, cytology and use in linkage mapping. *Genetics*, 107 :141-163.
- KHUSH G.S., BACALANGCO E. and T. OGAWA, 1990 — A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*. *Rice Genet. Newslet.*, 7 : 121-122.

- KHUSH G.S., BRAR D.S., MULTANI D.S. and A. SANCHEZ, 1991 — *Secondary trisomies and linkage mapping in rice*. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona, USA. October 2-5, 1991. Abstracts : p 6.
- KINOSHITA T., 1984 Gene analysis and linkage map. *In Biology of rice*. S. Tsunoda and N. Takahashi (eds). Japan Sci. Soc. Press. Tokyo. Elsevier, Amsterdam : 187-274.
- Mc COUCH S.R., KOCHERT G., YU Z.H., WANG Z.Y., KHUSH G.S. COFFMAN W.R. and S.D. TANKSLEY, 1988 Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, 76 : 815-829.
- Mc COUCH S.R., GUIDERDONI E., COURTOIS B. and S.D. TANKSLEY, 1989 Evaluation of an anther culture-derived doubled haploid population for RFLP mapping. Third annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. St Louis, Missouri, USA. March 8-10, 1989.
- Mc COUCH S.R. and TANKSLEY S.D., 1991 — Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. *In : Rice Biotechnology*, G.S. Khush and G.H. Toenniessen (eds). Biotechnology in Agriculture. Series 6, CAB and IRRI : 109-133.
- MACKILL D.J., WANG Z.Y. and S.D. TANKSLEY, 1990 — Linkage between an RFLP probe and a photoperiod sensitivity gene. *Rice Genetic Newsletter*, 7: 145-147.
- NAYAR N.M., 1973 Origin and cytogenetics of rice. *Adv. Genet.*, 17 :153-292.
- PANAUD O., BRAR D.S. and G.S. KHUSH, 1991 — Molecular evidence of genetic recombination between cultivated rice *O. sativa* and the wild relative *O. brachyantha*. *J. Hered.* (accepted).
- PHAM J.L., GLASZMANN J.C., SANO R., BARBIER P., GHESQUIERE A. and G. SECOND, 1990 — Isozyme markers in rice : genetic analysis and linkage relationships. *Genome*, 33 : 348-359.
- RAYMOND M., CALLAGHAN A., FORT P. and N. PASTEUR, 1991 — World-wide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, 350: 151-153.
- RONALD P.C., WU K. and S.D. TANKSLEY, 1991 — *Molecular analysis of bacterial blight resistance. Molecular mapping of the rice genome*. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona, USA. October 2-5, 1991. Abstracts : p 137.
- SECOND G., 1982 Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryza spp.*): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jap. J. Genet.*, 57 :25-57.
- SECOND G., 1985 — Evolutionary relationships in the *Sativa* group of *Oryza* based on isozyme data. *Génét. Sél. Evol.*, 17 (1) : 89-114.
- TAILLEBOIS J. et E. GUIMARÆES, 1987 — Obtention chez le riz de lignées femelles permettant une production économique de semences hybrides. *Agron. Trop.*, 42 (2) : 121-125.
- TANKSLEY S.D., 1991 *Molecular characterisation of the tomato nuclear genome*. Third International Congress of Plant Molecular Biology. Tucson, Arizona, USA. October 6-11, 1991. Abstracts.
- TANKSLEY S.D., YOUNG N.D., PATERSON A.H. and M.W. BONIERBALE, 1988 — RFLP mapping in plant breeding New tools for an old science. *Biotechnology*, 7: 257-264.
- TANKSLEY S.D., AHN N., CAUSSE M., CHUNGWONGSE J., FULTON T., RONALD P., SECOND G., WU K., YU Z., WANG Z. and J. XIAO, 1991 — *Molecular mapping of the rice genome*. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona, USA. October 2-5, 1991. Abstracts : p 3-4.

- WU K.S., GLASZMANN J.C. and G.S. KHUSH, 1988 — Chromosomal location of ten isozyme loci in rice (*Oryza sativa* L.) through trisomic analysis. *Bioch. Genet.*, 26: 303-320.
- YANO M., SAITO A., KAWASE M., KISHIMOTO N., NAGAMINE T., KATSUBA M., NAKAGHARA M., YOSHIMURA S., YOSHIMURA A. and N. IWATA — Towards the integration of a restriction fragment length polymorphism map and conventional genetic map of rice *O. sativa* L. In Proc. 2nd Intern. Rice Genet. Symp. IRRI, Los Banos, Philippines. may 14-18, 1990. (in press).
- YU Z.H., MACKILL D.J., BONMAN J.M. and S.D. TANKSLEY, 1991 — Tagging genes for blast resistance via linkage to RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 81: 471-476.

- WILK S., GLASZMANN J.C. and S.D. TANKSLEY, 1991 — Molecular mapping of the rice genome. Third annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. St. Louis, Missouri, USA, March 8-10, 1989. Abstracts, p. 107-120.
- YANO M., SAITO A., KAWASE M., KISHIMOTO N., MAGAMINE T., KATSUBE M., YAKAACHARA M., YOSHIMIZU S., YOSHIMIZU A. and YANO M., 1990 — Towards the integration of a resistance gene into the map and conventional genetic map of rice. *Oryza sativa* L. (Wetland Rice). Rice Genet. Symp. IRRRI Los Banos Philippines, 1990 (in press).
- YANO M., MACKILL D.J., BONMAM K.M. and S.D. TANKSLEY, 1991 — Genes for blast resistance via linkage RFLP markers. *Genetics*, 117: 111-124.
- Mc COUCH S.R., GUIDI ROJINI B., COURTOIS B. and S.D. TANKSLEY, 1991 — Evaluation of an anchor culture-derived doubled haploid population for RFLP mapping. Third annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. St. Louis, Missouri, USA, March 8-10, 1989.
- Mc COUCH S.R. and TANKSLEY S.D., 1991 — Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. In *Rice Biotechnology* G.S. Khush and G.H. Tomlinson (eds). Biotechnology in Agriculture, Series 6. CAB and IRRRI, 109-131.
- MACKILL D.J., WANG Z.Y. and S.D. TANKSLEY, 1990 — Linkage between an RFLP probe and a photoperiod sensitivity gene. *Rice Genetic Newsletter*, 7: 145-147.
- NAYAR N.M., 1973 — Origin and cytogenetics of rice. *Adv. Genet.*, 17: 133-292.
- PANAUD D., BRAY D.S. and A.S. KHUSH, 1991 — Molecular evidence of genetic recombination between cultivated rice (*Oryza sativa*) and the wild relative *O. rufipolyploidea*. *J. Hered.* (accepted).
- PHAM J.L., GLASZMANN J.C., SANO R., BARRIER P., GHESQUIERE A. and G. SECONO, 1990 — Isozyme markers in rice: genetic analysis and linkage relationships. *Genome*, 33: 348-359.
- RAYMOND M., CALLAGHAN A., FORT P. and N. PASTEUR, 1991 — Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, 350: 151-153.
- RONALD P.C., WU K. and S.D. TANKSLEY, 1991 — Molecular analysis of bacterial blight resistance. *Molecular mapping of the rice genome*. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona, USA, October 2-5, 1991. Abstracts, p. 117.
- SECONO G., 1982 — Origin of the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza sativa*) by study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jap. J. Genet.*, 57: 25-37.
- SECONO G., 1983 — Evolutionary relationships in the *Oryza* group of *Oryza* based on isozyme data. *Genet. Sel. Evol.*, 17 (1): 89-113.
- TATLEBOIS J. G. E. GUIMARÃES, 1987 — Obtenção de riz de ligões lençóis permitindo a produção econômica de sementes híbridas. *Agron. Trop.* 42(2): 121-125.
- TANKSLEY S.D., 1991 — Molecular cartography of the human nuclear genome. Third International Congress of Plant Molecular Biology. Tucson, Arizona, USA, October 9-11, 1991. Abstracts.
- TANKSLEY S.D., YOUNG N.D., PATERSON A.H. and M.W. BONNERHALE, 1988 — RFLP mapping in plant breeding — New tools for an old science. *Biotechnology*, 7: 263-264.
- TANKSLEY S.D., AHN S., CAUSSE M., MUNGWONGSE J., FUJIBON T., RONALD P., MURPHY G., WILK S., YANO M., WANG Z. and A. XIAO, 1991 — Molecular mapping of the rice genome. 4th annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona, USA, October 2-5, 1991. Abstracts, p. 3-4.

# Gestion d'une banque de gènes : l'exemple du Service des Ressources Génétiques du Canada

Bradley FRALEIGH \*

*Résumé* : Plus de 100 000 échantillons de semences et 2 400 échantillons clonaux sont préservés dans deux banques de gènes. Le service constitue et maintient notamment des collections mondiales de base d'orge et d'avoine. Ses activités en ce qui concerne l'obtention, la conservation, le maintien, l'évaluation, la documentation et la distribution des ressources génétiques seront présentées et discutées. La nature multidisciplinaire de ces activités est illustrée par la multiplicité de personnes et d'institutions que le gestionnaire doit connaître et satisfaire. Si la gestion des ressources phytogénétiques devra un jour dépasser le stade de conservation statique dans des chambres froides, il sera nécessaire d'analyser de façon beaucoup plus systématique la structure et l'envergure de la diversité génétique des échantillons préservés dans les banques de gènes existantes.

*Abstract* : Over 100,000 seed samples and 2,000 clonal accessions are preserved at two genebanks. The centre maintains and develops principal world base collections of oats and barley. Activities related to the acquisition, conservation, maintenance, evaluation, documentation and distribution of plant germplasm are presented and discussed. The multidisciplinary nature of genetic resources management is illustrated by the amount and variety of people and institutions with whom the manager must communicate and satisfy. In order to progress some day beyond the stage of static coldroom-type plant genetic resources management, it will be necessary to systematically study the nature and extent of the genetic diversity preserves in current genebanks.

(Article non communiqué).

\* Ressources Phytogénétiques du Canada, Biosystematics Research Centre, Central Experimental Farm, Wm. Saunders Bldg., Ottawa, Ontario K14 006, Canada.

מבוא  
א)

מבוא  
א)

# Organisation de la variabilité - et utilisation des ressources génétiques du dattier (*Phoenix dactylifera* L.) des palmeraies algériennes

Robert-Ali BRAC DE LA **PERRIÈRE** \*

*Résumé:* Support de l'ancien système agricole d'oasis, le palmier dattier demeure la culture de rapport la plus prometteuse pour les régions hyperarides d'Algérie. A partir d'un état des lieux des palmeraies atteintes ou menacées par une **fusariose** très active, notre équipe s'est intéressée à l'utilisation de la diversité **variétale** qui oppose une inertie à l'évolution de la maladie. L'organisation de la variabilité génétique des palmeraies est approchée à partir des données d'enquêtes et de prospections systématiques qui se poursuivent depuis une dizaine d'années. La méthodologie et les descripteurs morphologiques ont été standardisés pour le Maghreb. Pour l'ensemble du verger **phoenicole** plusieurs centaines de cultivars ont été identifiés. Différents niveaux d'analyses biochimiques (composés **flavoniques**, **isoenzymes**) complètent les identifications de terrain et confirment une variabilité génétique **intra-cultivar**. Les ressources génétiques du palmier dattier ne peuvent plus être partout entretenues de manière dynamique alors que l'agriculture d'oasis s'oriente vers une économie de marché. La conservation *in situ* des ressources génétiques s'appuie sur la sélection à base génétique large des palmeraies traditionnelles.

*Mots-clés:* palmier, ressources génétiques, **fusariose**, conservation, Algérie.

*Abstract :* Support of the **oases' autosubsistence** agriculture, the date palm remains for the future the most attractive crop for the hyper-arid lands in Algeria. Our team brought up to date the data on **fusariosis** wilt which is rapidly gaining and showed how the local varietal diversity can be used to fight the wilt's evolution in many traditional palm groves. The organisation of genetic variability inside the palm groves is analysed from the collected data of systematic surveys carried out for ten years. The methodology and preliminary standard descriptors list have been established at a North African level. Several hundreds of cultivars have been yet characterized. Biochemical analysis (**flavonoids** and enzyme markers) complement the **biometric** evaluation given precise information of **intra-cultivar** genetic diversity. The genetic resources of the date palm can no more be kept up everywhere as the **Saharian** agriculture focuses on a market economy. An *in situ* conservation strategy is developed based on the broad genetic selections of traditional palm groves.

*Key words:* date-palm, genetic resources, **fusariosis**, dynamic conservation, Algeria.

\* Unité de Recherches sur les **Zones** Arides, BP 119, Alger Gare, 16 000 Algérie.

## Introduction

Un passage au GPD (Laboratoire de Génétique et Physiologie du Développement des Plantes dirigé par J. Pernès) laisse des traces. On y acquiert dans la discipline des ressources génétiques des réflexes méthodologiques qui structureront les travaux engagés ultérieurement. Ainsi, quelques principes de base appris dans le laboratoire de Jean Pernès à Gif-sur-Yvette ont probablement eu une résonance au Sahara sur le programme algérien d'évaluation des ressources génétiques du palmier dattier. Cette espèce, *Phoenix dactylifera*, est la seule du genre à pouvoir s'adapter aux régions les plus chaudes et les plus arides de la planète. A la base de l'alimentation des sociétés agricoles traditionnelles du Sahara, le dattier reste probablement pour l'agriculture des régions désertiques la meilleure source de rapport dans les années à venir (Brac de la Perrière et Dubost, 1987).

En Algérie la palmeraie concerne environ 100 000 hectares, la presque totalité de la surface agricole utile des régions situées au dessous de l'isohyète 100 mm/an. Le verger phoenicicole est évalué entre 6 et 8 millions d'arbres dont le tiers environ concerne une agriculture de rente, essentiellement la variété de datte Deglet Nour ; les deux autres tiers, produisant 120 000 tonnes de dattes diverses, alimentent les producteurs et le marché local. La culture évolue peu à peu en se détachant de sa fonction vivrière pour être seulement perçue dans une logique marchande : les lois de l'économie préconisent la mise en place d'une phoeniculture de marché sur la base du clone Deglet Nour essentiellement (Dubost, 1991).

Les chercheurs de l'Unité de Recherches sur les Zones Arides (URZA) dirigée par Nicole Bounaga ont débuté un programme d'inventaire et d'évaluation des ressources génétiques au début des années 1980 auquel nous avons été associés. L'équipe de URZA menait des recherches fondamentales sur le palmier dattier et la fusariose (Bounaga et Bounaga, 1973 ; Bouguedoura, 1980 ; Bounaga, 1985) à partir d'échantillons prélevés au hasard dans plusieurs palmeraies, mais ne pouvait se baser sur aucun inventaire ou étude de la population dattière pour orienter son échantillonnage, ni s'assurer de la reproductivité des analyses et généraliser les résultats. A travers la présentation des travaux de recherches sur l'organisation de la variabilité et l'utilisation des ressources génétiques du palmier dattier des palmeraies algériennes, je soulignerai les lignes forces de notre démarche où nous retrouvons certains principes hérités de notre formation à « l'Ecole Pernès ».

## Reconnaissance du savoir paysan

*Les palmeraies anarchiques traditionnelles génèrent un ordre dynamique*

Pour un généticien des plantes, il faut une certaine dose d'inconscience ou d'ingénuité pour s'en prendre au palmier dattier. La diocie implique une importante hétérozygotie des structures de départ et interdit toute possibilité d'autofécondation. Il faudra six à dix ans pour voir les fruits des

premiers croisements, disposer de ressources en eau en quantité et sur de longues périodes pour irriguer quelques milliers de dattiers dans une zone hyperaride qui par définition en est dépourvue. Obstination sacerdotale pour quelques obtentions **variétales** probablement déclassées par rapport à l'évolution socio-économique très rapide des palmeraies. Les travaux d'amélioration les plus conséquents ont débuté aux Etats-Unis en 1948, mais la clôture définitive des recherches sur le palmier dattier à la station californienne d'**Indio** en 1978 constitue l'ultime tentative outre-Atlantique (Carpenter et Ream, 1976). De par le monde, pas un nouveau clone issu d'un programme génétique n'a encore été vulgarisé. Que ce soit pour lutter contre des maladies ou pour améliorer la qualité fruitière, les scientifiques doivent faire preuve de beaucoup d'humilité. Avant de s'engager dans des programmes d'amélioration classique convergeant vers la sélection d'un **idéotype**, il leur faut prendre la peine de comprendre la logique d'un système qui paraît suranné, surtout s'ils sont censés l'améliorer (Brac de la Perrière, 1987).

L'analyse de l'inventaire exhaustif d'une petite palmeraie traditionnelle du Sud-Ouest algérien (Béni-Abbés) de 40 000 palmiers nous a permis d'analyser la nature de la population **phoenicicole**. Celle-ci reflète une organisation ancienne, du temps où les habitants de l'oasis dépendaient étroitement de la production **dattière** (Brac de la Perrière et Bounaga, 1990). La palmeraie possède une composition **variétale** distribuée dans le terroir selon certains paramètres qui correspondent à chaque fois à des caractéristiques agronomiques mais aussi socio-économiques. On a pu mettre également en évidence une répartition spatiale des cultivars en relation avec les foyers de **fusariose**, les cultivars les plus résistants étant favorisés dans les parties contaminées (Brac de la Perrière et Bounaga, 1991). Sur les 40 cultivars, l'**endémisme** de certains cultivars majeurs témoigne de la dynamique d'une sélection locale et de la faiblesse du flux d'échange d'une palmeraie à l'autre. Ces anciennes palmeraies forment les zones de diversité des ressources génétiques du palmier dattier, micro-centres « de création et d'entretien de variations par les jeux de l'hybridation et de la sélection face à un environnement hétérogène et variable » (Pernès, 1984).

## Approche populationnelle

*La résistance n'est pas le fait d'un génotype mais d'une population*

Depuis une décennie, nous avons prospecté la plupart des palmeraies algériennes avec un double objectif : 1) situer la **fusariose** et retrouver des cultivars résistants, les identifier et connaître leur aire de distribution ; 2) inventorier les ressources génétiques du palmier dattier cultivé et analyser l'organisation de la variabilité. Nous présentons ici les principaux résultats déjà obtenus.

1. Nous avons récemment actualisé la situation de la **fusariose** sur le terrain (Brac de la Perrière et Benkhalifa, 1991). La moitié des communes **phoenicoles** de la partie Ouest du Sahara algérien se trouve d'ores et déjà contaminée par un champignon pathogène existant probablement depuis des siècles sous forme saprophyte dans la microflore des sols des oasis **maro-**

cains : *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Le bayoud, terme consacré mais ne correspondant pas toujours aux appellations régionales en Algérie, ne concerne pas les palmeraies de la moitié Est du pays. Par contre le phénomène s'intensifie dans les palmeraies contaminées depuis des dizaines d'années et gagne de proche en proche toutes les oasis occidentales. On constate une grande diversité de situations qui commande une diversité de réponses de lutte, en particulier en utilisant dans la variabilité génétique entretenue par les cultivateurs les clones les plus tolérants (Bounaga *et al.*, 1992).

2. Les prospections de la plus grande partie de la palmeraie algérienne distribuée sur près d'un million de kilomètres carrés ont permis l'identification de plus de 700 cultivars (Benkhalifa *et al.*, 1992). Formellement, ces cultivars sont des clones, mais l'identification de terrain à partir des appellations vernaculaires et quelques caractéristiques générales ont mis en évidence des homonymes et des variations de caractères agronomiques comme la tolérance à la fusariose pour un même cultivar (Brac de la Perrière et Benkhalifa, 1989). Une méthodologie d'inventaire variétale par échantillonnage a été élaborée et des fiches d'enquêtes et de descripteurs standardisés ont été établies pour les trois pays du Maghreb (Collectif Atelier d'El Goléa, 1990).

Une partie du verger est composée d'individus issus de graines, les mâles et les francs, beaucoup plus difficiles à identifier puisque formant une population hétérogène répartie sur l'ensemble de la palmeraie. L'évaluation agro-morphologique des mâles, élément rare (1 (Y0) mais nécessaire à la fécondation, a porté sur des individus en collection. Les premiers résultats indiquent un large polymorphisme à l'intérieur des types définis par les cultivateurs (correspondant aux cultivars le plus ressemblant) et une faible corrélation entre les caractéristiques de production pollinique et les autres caractères phénotypiques (Babahani *et al.*, 1992). La proportion des francs (palmiers femelles produits par voie sexuée) varie beaucoup d'une palmeraie à l'autre (1 % à 15 %). Cette population très variable à partir de laquelle l'agriculteur traditionnel sélectionne ses têtes de clones est proscrite dans les vergers modernes car elle encombre la palmeraie au détriment des clones de qualité. Bien qu'on observe une dynamique de sélection par les agriculteurs de quelques régions isolées (Brac de la Perrière et Benkhalifa, 1989), la tendance est à l'adoption de quelques standards de variétés commerciales. L'érosion génétique des palmeraies de l'Est devient manifeste avec la disparition d'un grand nombre de cultivars rares et la perte d'intérêt pour une sélection locale (Hanachi et Khitri, 1991). Partout où les conditions pédo-climatiques lui sont favorables, le cultivar Deglet Nour répondant au standard du marché international se généralise, formant de plus en plus souvent des plantations monoclonales.

## L'intégration de différents niveaux d'analyses

*Les centres sont constitués à partir d'études apparemment ponctuelles et indépendantes et dont la cohérence n'apparaît que progressivement (Pernès, 1984)*

Les enquêtes de terrain et les observations préliminaires ne sont pas suffisantes pour identifier les cultivars, mais peut-on s'en dispenser ? Le retour fréquent aux fiches d'enquête initiales constitue parfois l'ultime re-

cours pour une juste interprétation des résultats d'analyses. Ces fiches consignant des descriptifs **ethno-botaniques** et quelques caractéristiques du pied-mère échantillonné ont fait l'objet de remaniements successifs. L'agencement cohérent des descripteurs, une terminologie précise et commune des modalités ont été formulés pour le palmier dattier sur les caractères du fruit et de la graine, les plus couramment utilisés pour la détermination **variétale** pour aboutir à un standard maghrébin. L'analyse de données sur ce groupe de descripteurs nous permet d'obtenir une première représentation de l'organisation de la variabilité des cultivars des régions prospectées (Benkhalifa, 1989 ; Hanachi et Khitri, 1991). Les projections graphiques sur les plans factoriels issus des analyses **multivariées** montrent l'absence de groupe bien délimité indiquant une population **variétale** issue de multiples recombinaisons, une plasticité des caractères liés aux conditions **pédo-écologiques**, un polymorphisme comparable en importance **d'une zone d'échantillonnage à l'autre**.

Un autre groupe de caractéristiques phénotypiques plus délicates à recueillir, sensibles aux conditions du milieu, concerne les caractères végétatifs et **inflorescentiels**. Un grand nombre de descripteurs sont actuellement testés pour retenir ceux présentant une stabilité en fonction de l'âge et de l'environnement, discriminant bien les cultivars. D'autres analyses concernent les utilisations agronomiques sur des palmiers en collection : les corrélations des caractères végétatifs avec les caractères de production, la comparaison des cultivars avec les mâles du même type (Salmi, 1988 ; Dib, 1991 ; Babahani, 1991).

L'évaluation par les méthodes de biologie moléculaire est utilisée pour mesurer la divergence génétique entre les cultivars et s'assurer de l'homogénéité des clones. Deux types de marqueurs moléculaires sont principalement utilisés dans le laboratoire : les **flavonoïdes** et les protéines enzymatiques.

Les **flavonoïdes**, composés phénoliques généralement combinés à des sucres, sont des métabolites secondaires de plus en plus utilisés en **chimio-taxonomie**. Les travaux de Ouafi *et al.* (1989) ont porté sur l'analyse des profils des **aglycones flavones/flavonol** extraits de feuilles de plusieurs cultivars, qui apparaissent comme des marqueurs spécifiques du *Phoenix dactylifera*. L'analyse des profils HPLC des **hétérosides (O-glycosyl et C-glycosyl flavonoïdes)** a permis l'identification précise de 9 cultivars en collection et de déceler une variabilité **intra-cultivar** chez Taqerbucht, liée probablement à la présence de deux clones **phénotypiquement** proches (Ouafi *et al.*, 1992).

Les protéines enzymatiques sont des marqueurs biochimiques plus classiquement utilisés pour l'évaluation des ressources génétiques. En échantillonnant 35 cultivars sur l'ensemble des palmeraies algériennes, Bennaceur *et al.* (1990) ont montré un polymorphisme sur 7 systèmes enzymatiques pour une vingtaine testée. La variabilité génétique importante entre les cultivars est due à la fois à une forte **hétérozygotie** et à un pourcentage élevé de loci polymorphes. Les variations inter-régionales sont faibles. Les mêmes profils **isozymiques** sont obtenus pour les 40 échantillons d'un même cultivar, mais montrent aussi une variabilité pour quatre d'entre eux (Bennaceur *et al.*, 1992).

Les variations du cultivar **Taqerbucht** sont exemplaires. Ce cultivar, partout résistant à la **fusariose**, se retrouve dans la plupart des oasis contaminées du Sud-Ouest. Il produit un fruit tardif de bonne qualité se

conservant bien. Originaire probablement d'Aoughrouit où il est signalé à la fin du siècle dernier (Deporter, 1890), il a suivi ailleurs l'introduction de la fusariose. Les enquêtes recensent au moins cinq appellations différentes aux caractéristiques phénotypiques du fruit plus ou moins distinctes. Les analyses conduites sur plusieurs types de marqueurs moléculaires indiquent aussi des variations sensibles (Bennaceur et al., 1992 ; Ouafi et al., 1992) et appuient l'hypothèse d'un regroupement de clones phénotypiquement proches. Cette structure génétique originale pourrait être la conséquence d'une pression de sélection particulièrement forte sur les dattiers issus de graines de Taqerbucht dans les jardins contaminés par la fusariose.

La qualité des marqueurs, leur accessibilité (technique et financière) et leur utilisation respective sont pris en considération. Par exemple, on favorisera d'avantage les marqueurs moléculaires pouvant être extraits de feuille sèches, stables au cours du transport et faciles à analyser (glycosyl flavonoïde) par rapport à ceux (protéines) qui nécessitent le transport d'une bonbonne d'azote liquide au milieu du désert. On reste convaincu de la nécessaire intégration des différentes approches, plusieurs estimations de la variabilité confortant nos choix pour la gestion des ressources génétiques, les niveaux les plus proches du terrain n'étant pas les moins déterminants.

## La cohérence pluridisciplinaire

*S'il est un domaine où la transdisciplinarité ne peut être ni un luxe, ni une coquetterie d'école, c'est bien le terrain saharien (Marouf, 1987)*

Pour mener à bien ses travaux sur les ressources génétiques du palmier dattier, l'équipe de l'URZA a dans un premier temps accumulé les informations dans les spécialités représentées au sein du laboratoire : morphologie, microbiologie, biochimie. Au cours de nos enquêtes sur le terrain, nous avons parfois associé des agronomes de l'INRAA et des phytopathologistes de l'INPV. Pour la transcription et la signification des appellations berbères, nous avons fait appel aux linguistes et anthropologues. La mise en place de la base de données a demandé de vastes consultations. Le dynamisme de l'évolution de l'agriculture saharienne nous oblige à analyser avec des collègues économistes, sociologues et géographes l'extraordinaire développement des régions sahariennes d'Algérie (Bisson, 1983 ; Dubost, 1991).

Si nous constatons avec eux que « la désocialisation [dans les oasis] liée en partie à la présence coloniale, a rendu caduque et elle seule, la rationalité technique, qui pour parfaite qu'elle put être, ne peut plus aujourd'hui se reproduire sur d'autres bases » (Marouf, 1987), nous devons aussi nous interroger sur les résultats d'une modernisation animée par la vision développementaliste des années 1970. L'érosion génétique est fille du modernisme ; la culture monoclonale de Deglet Nour, avec presque 2 millions d'arbres du même génotype couvre déjà 20 000 ha dans les palmeraies de l'Est algérien seulement. Si l'agriculture est moderne, elle doit prendre en charge tous les éléments de sa survie, ce qui n'est pas le cas pour le palmier dattier. Les facteurs de production sont rares et coûteux et les services

techniques de l'agriculture n'ont pas les moyens d'intervenir en cas d'épi-phytie ; la progression continue de la fusariose dans les palmeraies de l'Ouest en est un exemple. Les structures étatiques de recherches considérablement appauvries depuis le milieu des années 1980 (Brac de la Ferrière, 1991) ne peuvent pas fournir l'expertise nécessaire, sélectionner de meilleurs clones dans des programmes d'amélioration, ni multiplier à la demande les génotypes les mieux adaptés à la fois aux conditions pédoclimatiques de chaque palmeraie et aux dictats du marché. Nous sommes dans une situation « d'entre-deux » où la palmeraie en se spécialisant se fragilise sans qu'une couverture technologique, nécessairement installée dans l'aire de culture du dattier, produise les instruments de sa valorisation et les garde-fous obligés de sa survie.

### Gestion dynamique *in situ* des ressources génétiques du dattier

... et on verra ainsi que conservation signifie clairement sélection (Pernès, 1984)

De quelle manière peut-on utiliser et conserver dans toute leur dynamique les éléments essentiels des ressources génétiques du dattier ? Pernès souligne « l'urgente nécessité de résoudre les problèmes d'organisation de conservation des variétés traditionnelles paysannes souvent couplées sans barrières reproductives absolues à des populations de formes sauvages ». Dans le complexe des *Phoenix*, on ne connaît pas non plus de barrière reproductive absolue (Nixon, 1936). Dans la palmeraie algérienne monospécifique, la population de francs joue sans doute le rôle des formes sauvages. L'inventaire méthodique et régulier des palmeraies, suivi de l'identification et de la caractérisation précise de chaque cultivar et des meilleurs francs, permet une analyse globale de la phoeniciculture et en particulier du produit des sélections paysannes. Ces informations doivent être gérées à partir d'une base de données des ressources génétiques qui fonctionnerait sur le principe de centralisation des données mais pas des génotypes, sauf pour des études de génétique quantitative sur des sous-ensemble très restreints soumis à des règles de croisements (frères-soeurs, back-cross) ou encore des essais agronomiques dans les stations.

La base de données palmier dattier est en cours d'élaboration (Benkhalifa et Nguyen-Van, 1992). Elle permet une vue d'ensemble qui autorise le chercheur à faire un choix parmi la sélection déjà effectuée par le paysan sur ce qui est le plus prometteur pour la région toute entière ou qui répond à des impératifs précis (résistance à une maladie, tolérance au sel, précocité...). Cette « sélection paysanne assistée » devrait faire émerger les meilleurs clones : multipliés en petite quantité et réintroduits dans leur région d'origine, enrichissant les palmeraies modernes de nouveaux génotypes, élaborant des composites de plusieurs clones de résistance moyenne pour les régions fusariées. La sélection paysanne assistée permettrait de s'opposer à l'érosion génétique non pas de façon conservatrice mais en parfaite adéquation avec les conditions écologiques et économiques régionales.

## Conclusion

Nous avons analysé les travaux sur les ressources génétiques du palmier dattier réalisés par l'équipe du laboratoire de phylogénétique à l'URZA en indiquant les grands principes structurants : choix d'une plante utile, reconnaissance du savoir paysan, approche populationnelle, niveaux d'analyse complémentaires, pluridisciplinarité et conservation dynamique. Un dernier principe sera abordé en conclusion : celui du flux.

Comme les gènes, les idées circulent, se recombinent, s'échangent entre les populations humaines. Aux flux des idées nouvelles qui ont présidé à la domestication des plantes à partir de quelques lieux précis de la planète répond, 10 000 ans plus tard, un flux contraire de reconnaissance du non-cultivé. Ces idées vont à contre-courant d'une tendance sélectionniste et marchande (à l'ère des biotechnologies et du marché planétaire, le brevetage des gènes et la reconnaissance de la propriété intellectuelle sur la matière vivante ne seront-elles pas les barrières reproductives des idées de demain ?). Jean Pernès a été l'artisan d'un de ces rétrocroisements salvateurs en produisant et faisant circuler les idées du couplage nécessaire de l'organisation de l'amélioration des plantes avec la préservation des ressources génétiques. Nous sommes redevable à Jean Pernès de concepts qui ont alimenté notre réflexion, conforté notre démarche. Dans son intelligence souple et fertile, le respect de l'autre et la solidarité à l'intérieur du pool génique humain comme intuition de survie n'était jamais absente.

Les relations entre l'être humain et le palmier dattier, dans les conditions particulières d'une aridité extrême à la lisière de l'oekumène, se distendent lorsque la normalisation des échanges permet l'intégration régionale, puis s'enchevêtrent de nouveau dans une sorte de symbiose lors de perturbations ou de cataclysmes comme la guerre. Notre stratégie de conservation dynamique et d'utilisation des ressources génétiques traduit notre souci d'aménager une permanence de la production du verger dattier quelles que soient les pressions (écologiques, économiques, parasitaires) dont il sera l'objet.

## Bibliographie

- BABAHANI S., DIB Y., et BRAC DE LA PERRIERE R-A., 1992 — Le polymorphisme des palmiers dattiers mâles (*Phoenix dactylifera* L.). Actes du colloque « Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes », Paris 8-10 janvier 1992.
- BENKHALIFA A., 1989 — *Ressources génétiques du palmier dattier et lutte contre la fusariose. Organisation de la variabilité des cultivars du dattier des palmeraies du Sud-Ouest algérien*. Thèse de Magister en Biologie Végétale, ENS, Alger. 110 p.
- BENKHALIFA A. et NGUYEN-VAN E., 1992 — *Elaboration d'une base de données sur le palmier dattier*. Actes du colloque « Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes », Paris 8-10 janvier 1992.
- BENKHALIFA A., BENMALEK S., BRAC DE LA PERRIERE R-A., HANAFI S. et KHITRI D., 1992 — *Prospections, inventaires et structures des palmeraies*.

- Actes du colloque « Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes », Paris 8-10 janvier 1992.
- BENNACEUR M., LANAUD C., CHEVALLIER M.H. et BOUNAGA N., 1991** — Genetic diversity of the Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) from Algeria revealed by enzyme markers. *Plant Breeding*, **107** : 56-69.
- BENNACEUR M., BRAC DE LA PERRIERE R-A. et BOUNAGA N., 1992** — Variabilité intra-cultivar de palmier dattier décelée par électrophorèse enzymatique. Actes du colloque « Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes », Paris 8-10 janvier 1992.
- BISSON J., 1983** — L'industrie, la ville, la palmeraie au désert. Un quart de siècle d'évolution au Sahara algérien. *Maghreb-Machreck.*, **99** : 5-29.
- BOUGUEDOURA N., 1980** — Morphologie et ontogenèse des productions axillaires du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. *C. R. Acad. Sci.*, **D, 291** : 857-860.
- BOUNAGA D. et BOUNAGA N., 1973** — Le palmier dattier et la fusariose : les vaisseaux. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord*, **64** : 3-23.
- BOUNAGA-RI VEIL N., 1985** — Contribution à l'étude du *Fusarium oxysporum* sp. albedinis (Killian et Maire) Gordon, agent de la fusariose du palmier dattier. Thèse d'Etat, Univ. Scienc. Techn. Houari Boumediene, Alger.
- BOUNAGA N., 1991** — Le palmier dattier : rappels biologiques et problèmes physiologiques. *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*. Groupe d'Étude de l'Arbre. Paris, France. pp 323-336.
- BOUNAGA N., BENKHALIFA A. et BRAC DE LA PERRIERE R-A., 1992** — Lutte contre la fusariose du dattier par l'utilisation d'une diversité génétique entretenue. Actes du colloque « Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes », Paris 8-10 janvier 1992.
- BRAC DE LA PERRIERE R-A., 1988** — Les recherches sur les ressources génétiques du palmier dattier en Algérie. *Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach*, **12 (1)** : 493-506.
- BRAC DE LA PERRIERE R-A. et BOUNAGA N., 1990** — Etude du verger phoenicicole d'une palmeraie traditionnelle (Béni-Abbès, Sud-Ouest algérien). I. Inventaire exhaustif et composition variétale. *Rev. Rés. Amél. Prod. Agr. Milieu Aride*, **2** : 9-18.
- BRAC DE LA PERRIERE R-A. et BOUNAGA N., 1991** — Etude du verger phoenicicole d'une palmeraie traditionnelle (Béni-Abbès, Sud-Ouest algérien). II. Répartition spatiale des cultivars en relation avec la fusariose. *Rev. Rés. Amél. Prod. Agr. Milieu Aride*, **3** : 81-90.
- BRAC DE LA PERRIERE R-A., 1991** — La recherche scientifique victime de la banqueroute africaine. *Le Monde Diplomatique*, **448** : 22-23.
- BRAC DE LA PERRIERE R-A. et BENKHALIFA A., 1991** — Progression de la fusariose du palmier-dattier en Algérie. *Sécheresse*, **2** : 119-128.
- BRAC DE LA PERRIERE R-A. et BENKHALIFA A., 1989** — Identification des cultivars de dattiers (*Phoenix dactylifera* L.) du Sud-Ouest algérien. *Plant Genetic Resources Newsletter*, **78/79** : 13-20.
- CARPENTER J.B. et REAM C., 1976** — Date palm breeding, a review. *Date growers' Inst. Rep.*, **53** : 25-33.
- CLEMENT G., 1990** — *Le jardin en mouvement*. Pandora éditions, 103 p.
- COLLECTIF ATELIER EL GOLEA, 1990** — Le palmier dattier, méthodologie de prospections. Atelier El Goléa 6-10 Mai 1990. *Bull. Amél. Prod. Agr. Milieu Aride*, **5** : 79-92.
- DEPORTER V., 1890** — *Extrême Sud de l'Algérie*. Imprimerie P. Fontana et compagnie, Alger, 473 p.

- DIB Y., 1991 — *Caractérisation et évaluation des palmiers dattiers mâles (dokkars) de la stations ITDAS d'El Arfiâne*. Mémoire d'Ingénieur d'Etat en Agronomie, ITAS, Ouargla.
- DJERBI M., 1988 — *Le projet régional PNUD/FAO de lutte contre le bayoud*. Table ronde sur le bayoud. Alger 19-20 septembre 1988: 17-22.
- DUBOST D., 1991 — *Ecologie, Aménagement et Développement agricole des oasis algériennes*. Thèse de Doctorat d'Université en Géographie et Aménagement du Monde Arabe, Tours, 549 p.
- HANACHI S. et KHITRI D., 1991 — *Inventaire et identification des cultivars de la cuvette de Ouargla. Organisation de la variabilité*. Mémoire d'Ingénieur d'Etat en Agronomie, ITAS, Ouargla, 82 p.
- MAROUF N., 1987 — *Introduction au colloque sur les perspectives de l'agriculture saharienne*. Acte du Colloque d'Adrar 23-26 février 1986, URASC, Oran, : 6-13.
- NIXON R.W., 1936 — *Metaxenia and interspecific pollinisations*. In *Phoenix. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 33: 21-26.
- OUAFI S., GACEB-TERRAK R., BOUNAGA N. et LEBRETON P., 1988 — *Les flavonoïdes, marqueurs infraspécifiques chez le palmier dattier*. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **306**: 399-404.
- OUAFI S., BRAC DE LA PERRIERE R-A., BOUNAGA N., LEBRETON P., 1992 — *Les glycosides flavoniques, marqueurs infra-spécifiques du palmier dattier (Phoenix dactylifera L.)*. Actes du colloque « Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes », Paris 8-10 janvier 1992.
- PERNÈS J., 1984 — *Gestion des Ressources génétiques des plantes*. Tome I et II, ACCT, Paris.
- SALMI M., 1988 — *Etude comparative de la floraison et de la nouaison de deux cultivars de palmier dattier : Feggus et Taqerbuchi*. Thèse d'ingénieur en Agronomie, ITA Mostaghanem.

# Système de reproduction et organisation de la diversité génétique dans le genre *Citrus*

Patrick OLLITRAULT et Xavier FAURE \*

**Résumé:** Le genre *Citrus* se singularise par l'apomixie partielle de très nombreux génotypes. Celle-ci est à l'origine d'une taxonomie traditionnelle, qui a haussé au rang d'espèces des groupes de mutants dérivants d'un même génotype hybride ancestral. Ceci est clairement démontré par les structures intraspécifiques mises en évidence grâce à l'analyse de dix systèmes enzymatiques. La multiplication végétative, l'incompatibilité gamétophytique, la sélection et les subdivisions naturelles de l'aire de diversification ont par ailleurs forgé l'organisation de la diversité génétique du genre *Citrus*. Celle-ci se structure fortement autour de trois pôles se distinguant clairement tant au niveau morphologique que moléculaire : (1) le groupe des pamplemoussiers (*C. grandis*), et pomélos (*C. paradisi*) ; (2) le groupe des mandariniers (*C. reticulata*) qui présente beaucoup d'affinité avec les bigaradiers (*C. aurantium*) et les orangers (*C. sinensis*) ; (3) les cédratiers (*C. medica*) qui ont très certainement participé à la genèse des limetiers (*C. aurantifolia*) et à celle des citronniers (*C. limon*). Les mandariniers, pamplemoussiers et cédratiers, qui ont initialement évolué en allopatrie, présentent une différenciation de la taille de leur génome. Cette dernière et la polyembryonnie ont sans doute contribué à limiter la recombinaison entre ces trois espèces primaires des *Citrus* cultivés. Les fortes dépressions de consanguinité observées dans les descendance d'autofécondation ainsi que les nombreuses distorsions de ségrégation semblent témoigner de l'accumulation, à l'état hétérozygote, de mutations récessives défavorables. La multiplication végétative est sans aucun doute responsable de cette évolution. Les implications de ces structures sur les stratégies d'amélioration sont discutées.

**Mots-clés:** *Citrus*, apomixie, diversité génétique, relation phylogénique, évolution, isoenzymes, cytométrie en flux.

**Abstract:** Facultative apomixis is the main characteristic of the reproductive system of *Citrus*. It is responsible of many confusion in *Citrus* taxonomy. As demonstrated by intraspecific isozyme analysis (ten enzymatic systems), many traditional species are, in fact, different groups of mutants arising from a single ancestral genotype. Vegetative multiplication, autoincompatibility, selection, and geographical distribution has determined the actual genetic organisation. Molecular and morphological data

\* Station de Recherche Agronomique de San Giuliano, IRFA-INRA, 20230 San Nicolaò, France.

clearly permit to identify three basic taxa in *Citrus*: (1) *C. grandis* associated with *C. paradisi*, (2) *C. reticulata* closely related with *C. aurantium* and *C. sinensis*, (3) *C. medica* which seems to have a parenthood with *C. aurantifolia* and *C. limon*. Flow cytometry shows that these three basic species have different genome sizes. These variations and polyembryony have certainly contributed to limit recombination between the ancestral genomes and to preserve a high structuration in *Citrus*. Finally, it seems that inbreeding in polyembryonic species and abnormal segregation in controlled cross, can be related to the accumulation of recessive unfavorable mutations (in heterozygous status), favoured by vegetative multiplication. The implications of this structure for the management of genetic resources and citrus breeding are discussed.

*Key words* : *Citrus*, apomixis, genetic diversity, phylogenetic relationship, evolution, isozyme, flow cytometry.

## Introduction

Le terme d'agrumes correspond à trois genres botaniques : *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus* qui constituent un complexe d'espèces au sens défini par Pernès (1984). Ils appartiennent avec huit autres genres dont *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Clymenia*, *Citropsis* et *Severinia*, à la sous-tribu des *Citrinae*, tribu des *Citreae*, sous-famille des *Aurantioideae*, famille des *Rutaceae*, dans l'ordre des *Geraniales*. Le genre *Citrus* est subdivisé entre le sous-genre *Citrus* qui renferme tous les types comestibles et le sous-genre *Papeda*. Il présente une très grande diversité morphologique et pomologique. Celle-ci, associée à l'apomixie facultative de très nombreux génotypes, a rendu complexe le travail des taxonomistes. Si les premières descriptions de Linné et d'Hooker ne distinguaient que trois ou quatre espèces, les deux principales classifications actuelles répertorient respectivement 156 espèces (Tanaka, 1961) et 16 espèces dont 10 dans le sous-genre *Citrus* (Swingle et Reece, 1967). C'est cette dernière nomenclature que nous utiliserons. Par ailleurs, les apports de la taxonomie numérique (Barrett et Rhodes, 1976) et les études récentes de marquage moléculaire, comme celles des polyphénols et huiles essentielles (Scora, 1988), de l'ADN chloroplastique (Green *et al.*, 1986) ou des protéines (Handa *et al.*, 1986), font ressortir trois taxons de base dans le sous-genre *Citrus*. Ces différentes études font toutefois peu de cas de la diversité intraspécifique et ne décrivent pas l'hétérozygotie des cultivars.

Dans cet article, après un rappel bibliographique des principales caractéristiques du système de reproduction des agrumes, nous présentons une évaluation de l'organisation de la diversité génétique intra et interspécifique au sein du genre *Citrus*. Cette évaluation repose sur des études de polymorphisme enzymatique, de cytométrie en flux (ploïdie, taille des génomes), ainsi que sur l'analyse de descendance contrôlée (dépression de consanguinité et distorsions de ségrégation). Les structures génétiques mises en évidence sont ensuite confrontées aux principaux facteurs de gestion du polymorphisme (fondation, système de reproduction, sélection) afin de retracer l'évolution du genre *Citrus* et de discuter les implications pour la gestion des ressources génétiques et les stratégies de création variétale.

## Le système de reproduction des agrumes

### La polyembryonie

Chez de nombreux cultivars, les graines contiennent plusieurs embryons ; les embryons surnuméraires sont issus des cellules du **nucelle** (tissu somatique). L'embryon sexué est en compétition avec le ou les embryons nucellaires, à la fois pour l'espace et pour les éléments nutritifs. De cette compétition résulte une apomixie facultative dont le taux est grandement déterminé par le nombre d'embryons nucellaires, lui même contrôlé par le génotype maternel. Seules deux espèces (*C. medica* et *C. grandis*) ne présentent que des cultivars **monoembryonnés** (embryon sexué). Pour les autres, le degré de **polyembryonie** peut varier de manière importante suivant les variétés (Frost et Soost, 1968). La **polyembryonie** apparaît comme dominante et son degré est vraisemblablement déterminé par un petit nombre de gènes dans le genre *Citrus* (Cameron et Soost, 1979). Par ailleurs, dans les semis de cultivars **polyembryonnés**, les proportions de plants **zygotiques** et nucellaires sont également soumises aux conditions environnementales et aux génotypes des **pollinisateurs** (Khan et Roose, 1988).

### La stérilité gamétique

La stérilité pollinique est très souvent présente à des degrés variables. L'exemple de stérilité mâle le plus connu est celui de l'oranger Washington Navel. De plus, chez de nombreux cultivars comme les pomélos Marsh et Thompson, le citronnier Eureka, la proportion de pollen viable est faible : 5 à 15 %. La stérilité femelle est généralement due à une mauvaise évolution des tissus **gamétiques**. Ainsi chez les Satsuma comme chez les orangers Washington Navel, Hamlin, Valencia et le pomélo Marsh, le sac embryonnaire dégénère très fréquemment avant d'atteindre le stade 8 noyaux. Des études de cytogénétique ont permis de mettre en évidence l'origine de certaines stérilités totales ou partielles (Iwamasa, 1966). En effet, les translocations (p. ex., l'oranger Valencia), les inversions (p. ex., la lime mexicaine) ou les phénomènes **d'asynapsie** (*Citrus junos*) affectent à des degrés divers la fertilité des gamétophytes. Ces stérilités, entraînant l'**aspermie** des fruits, ont été sélectionnées par les **agrumiculteurs** ; elles constituent toutefois des culs de sac sur le plan évolutif.

### La compatibilité sexuelle

#### *Le système d'incompatibilité gamétophytique*

Auto et inter-incompatibilités sont présentes chez les agrumes. Tous les pamplemoussiers sont auto-incompatibles ; plusieurs hybrides ou supposés tels le sont également : les tangelos Orlando et **Minneola**, les cultivars Robinson, Nova, Page, Fairchild, le clémentinier. Certains cultivars d'oranger et de citronnier le seraient également (Frost et Soost, 1968). Certains cultivars auto-incompatibles sont également incompatibles en croisement :

Orlando et Minneola, Robinson Nova et Page (Hearn *et al.*, 1969). La plupart des hybrides entre cultivars auto-incompatibles présentent ce même caractère. Ces résultats sont cohérents avec une incompatibilité de type **gamétophytique**, gouvernée par une série d'allèles S. L'existence de huit allèles a été proposée par Soost (1969).

### *Les hybridations interspécifiques et intergénériques*

Mis à part le système d'incompatibilité **gamétophytique**, la compatibilité sexuelle est totale au sein du genre *Citrus*. Elle est par ailleurs très large avec les genres apparentés. Les premiers hybrides **intergénériques** entre *Citrus* et *Poncirus* et *Citrus* et *Fortunella* ont été réalisés par l'USDA dès 1897. Depuis, de très nombreuses combinaisons ont été testées (Barret, 1977; Iwamasa *et al.*, 1988). Ces travaux ont démontré la très grande compatibilité sexuelle entre *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* et *Microcitrus*. Les études d'affinité chromosomique chez les hybrides entre ces différents genres (Iwamasa et Nito, 1988) suggèrent qu'ils possèdent des structures chromosomiques très voisines. Ce, malgré une séparation de 20 à 30 millions d'années entre les trois premiers originaires d'Asie et les deux derniers d'origine australienne. En revanche, aucun plant n'a pu être obtenu par hybridation sexuée entre *Citropsis* et *Citrus*, ou *Citropsis* et *Fortunella* (Nito et Akihama, 1990).

### **Les polyploïdisations spontanées**

Dans les semis de graines **polyembryonnées**, la fréquence des tétraploïdes spontanés varie de 1 à 3 % (Barrett et Hutchison, 1978). Ces tétraploïdes seraient issus d'un doublement des tissus nucellaires de l'ovule. Des triploïdes peuvent être obtenus dans des descendance d'hybridations entre diploïdes et tétraploïdes, mais également entre deux diploïdes. Ils sont alors issus de la fécondation d'un gamète femelle non réduit par un gamète mâle haploïde (Esen et Soost, 1971). La fréquence de gamètes femelles non réduits varie suivant les génotypes entre moins de 1 % à près de 20 % (Iwamasa et Nito, 1988). Les pépins contenant un embryon triploïde présentent souvent un développement anormal en raison d'un ratio défavorable entre les niveaux de ploïdie de l'embryon **zygotique** et de l'albumen (Esen et Soost, 1973).

### **La propagation des porte greffe et cultivars**

Dans le Sud-Est Asiatique, aire d'origine des agrumes, subsistent des zones d'agrumiculture traditionnelle où les agrumes sont cultivés sur leurs propres racines et multipliés soit par marcotte, soit par semis pour les cultivars **polyembryonnés**. Ces méthodes de propagation, qui sont sans aucun doute les derniers témoins des techniques ancestrales, ont de nombreux désavantages. Le marcottage présente de grands risques de dissémination des maladies virales et bactériennes, et offre un taux de multiplication faible. Le semis, quant à lui, est pénalisé par l'expression des caractères de juvénilité et va, par ailleurs, à l'encontre de la recherche de cultivars à fruits aspermes. Enfin, la culture franc de pied nécessite de regrouper dans un même génotype

les caractères relatifs aux fruits et les caractères de résistance aux maladies ou d'adaptation aux sols. C'est pourquoi, en plantation commerciale, les agrumes, comme la majorité des arbres fruitiers, se présentent sous forme d'un complexe **cultivar/porte-greffe**. La multiplication des porte-greffes est classiquement réalisée par semis de graines **polyembryonnées**. Les cultivars sont, quant à eux, multipliés par greffage d'yeux ou par **surgreffage**. Que ce soit pour les porte-greffes ou les cultivars, la propagation est donc de type **clonale**.

## Les structures génétiques

### Variation de la taille du génome

Les tailles absolues des génomes de 34 agrumes ont été évaluées grâce à l'étude en **cytométrie** en flux (appareil **Facs**, Becton Dickinson, 448 nm, 15 mW), de noyaux colorés à l'iodure de **propidium** comparés à des noyaux de lymphocytes humains (Ollitrault et Michaux Ferrière, 1992). Par ailleurs les niveaux de **ploidie** d'une centaine d'autres agrumes ont été évalués dans des conditions expérimentales simplifiées, sans témoin interne.

#### Taille des génomes

Les tailles absolues du génome de 22 *Citrus* et 12 génotypes des genres apparentés, tous diploïdes, ont été estimées en retenant une taille de 6,54 **pg**/2C pour le génome humain (Arumuganathan et Earle, 1991a). Le génome des *Citrus* apparaît ainsi relativement petit (entre 0,85 **pg** et 0,98 **pg**), puisqu'il ne représente qu'environ 3 fois *Arabidopsis* (Arumuganathan et Earle, 1991b). Par ailleurs, des variations significatives de taille des génomes ont été mises en évidence entre différentes espèces diploïdes du genre *Citrus* (Figure 1). *C. medica* (cédratier) se distingue par sa plus forte taille de génome, tandis que *C. reticulata* (mandariniers) présente le plus petit génome. Les autres espèces, et en particulier *C. grandis* (pamplemoussiers), présentent une taille intermédiaire entre *C. medica* et *C. reticulata*. Les tailles des génomes des genres apparentés aux *Citrus* (*Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus*) sont très voisines de celles des *Citrus*, tandis que celle de *Severinia buxifolia* est significativement plus petite et celle de *Citropsis gilletiana*, plus élevée. Ces résultats sont sans doute à rapprocher des compatibilités en hybridations **intergénériques** précédemment exposées.

#### Niveau de **ploidie**

La quasi totalité des *Citrus* analysés sont diploïdes, seul trois triploïdes ont été identifiés sur la collection de Corse. Il s'agit d'un **autotriploïde** naturel, le **limetier** Tahiti et des pamplemoussiers **Oroblanco** et **Sweetie** créés par hybridations entre cultivars diploïdes et tétraploïdes. Ces résultats confirment les travaux des **cytologistes** qui ont montré que la **diploïdie** est de règle, avec un nombre de chromosomes de base de 9, chez tous les agrumes et genres apparentés (Krug, 1943 ; Iwamasa et Nito, 1988). La lime

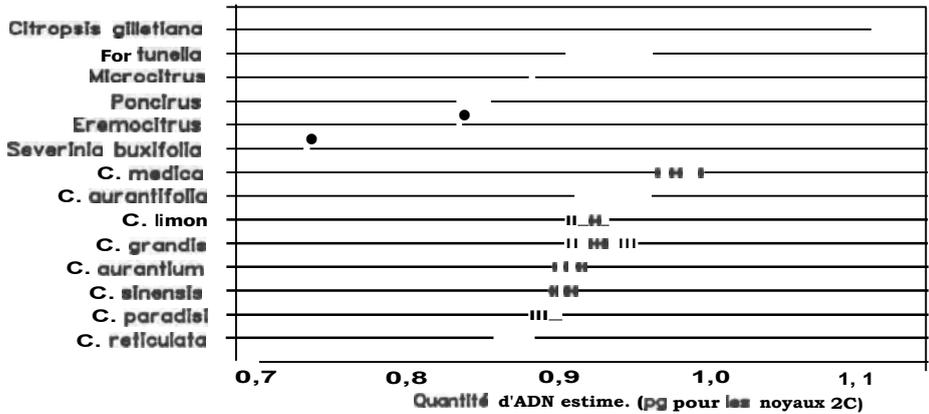


Fig. 1. — Variation de la taille du génome dans le genre *Citrus* et les genres apparentés.

Tahiti, quelques *Poncirus* tétraploïdes et les formes tétraploïdes de *Fortunella hindsii* constituent ainsi les rares exemples de polyplœïdes spontanés chez les agrumes.

### Structuration de la diversité génétique dans le genre *Citrus*

L'analyse du polymorphisme enzymatique nous a permis de préciser l'organisation génétique du genre *Citrus*. Dix systèmes enzymatiques ont été étudiés sur gel d'amidon ou de polyacrylamide : Isocitrate-déshydrogénase (ICD), Alcool-déshydrogénase (ADH), Malate-déshydrogénase (MDH), Phospho-Glucose-Isomérase (PGI), Phospho-Glucomutase (PGM), Leucine-Amino-Peptidase (LAP), Endopeptidase (End), Aspartate-Amino-Transférase (AAT), Peroxydase anodiques et diaphorase. Seize loci polymorphes sont mis en évidence par l'analyse de trois organes (feuille, écorce et pollen ; Ollitrault et Faure, 1992).

#### Les structures intraspécifiques

Les structures intraspécifiques évaluées à partir de 10 génotypes par espèce (à l'exception des cédratiers pour lesquels seuls 4 cultivars ont été analysés) apparaissent très contrastées (Tableau 1) :

- *Citrus medica* (cédratier) présente une diversité allélique très faible due à une forte homozygotie et un faible polymorphisme entre cultivars.
- *Citrus paradisi* (pomélo), *C. sinensis* (oranger) et *C. aurantium* (bigaradier) présentent des structures intraspécifiques similaires. La diversité allélique et l'hétérozygotie sont modérées et le polymorphisme intercultivar est inexistant.
- *Citrus limon* (citronnier) est très hétérozygote mais présente très peu de polymorphisme intervariétal puisque seul le citronnier Meyer se distingue des autres cultivars.
- *Citrus latifolia* et *C. aurantifolia* (limetiers à gros et à petits fruits) sont également fortement hétérozygotes.

• *Citrus grandis* (pamplemoussier) et *C. reticulata* (mandarinier) offrent une très grande richesse allélique principalement due à un important polymorphisme intervariétal. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Torres et al. (1978) pour 4 systèmes enzymatiques, ainsi qu'avec ceux de Roose (1988) pour une analyse du RFLP nucléaire.

Tableau 1 : Diversités intraspécifiques des *Citrus* cultivés

Espèces	Taux d'identification variétale	Hétérozygotie	Nombre moyen d'allèles par locus
<i>C. aurantium</i>	1/10	0,36	1,4
<i>C. sinensis</i>	1/10	0,36	1,4
<i>C. paradisi</i>	1/10	0,46	1,5
<i>C. medica</i>	1/4	0	1
<i>C. limon</i>	2/10	0,72	1,9
<i>C. aurantifolia</i>	5/10	0,60	1,9
<i>C. reticulata</i>	9/10	0,16	1,8
<i>C. grandis</i>	10/10	0,17	2

### Les relations interspécifiques

Les données relatives aux 74 génotypes étudiés précédemment ont été traitées par une analyse factorielle des correspondances (26 allèles actifs). La représentativité élevée (56 %) des deux premiers axes de l'AFC (Figure 2) témoigne d'une forte structuration de la diversité génétique dans le genre *Citrus*. Celle-ci s'organise autour de trois pôles. Le premier regroupe les

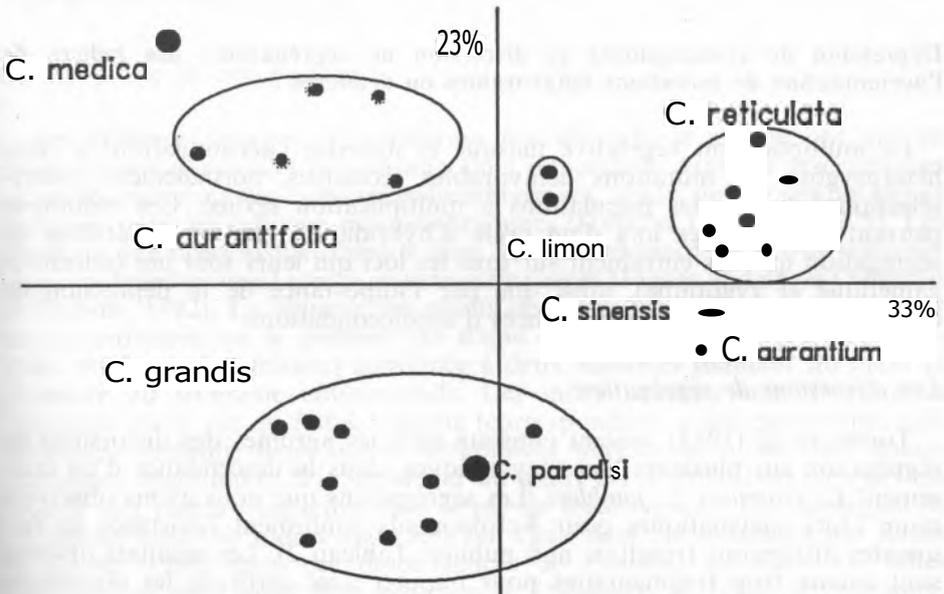


Fig. 2. Organisation de la diversité enzymatique des *Citrus* cultivés (AFC sur 26 allèles).

mandariniers (*C. reticulata*), qui bien que polymorphes, constituent une entité bien différenciée, à laquelle peuvent être associés les orangers (*C. sinensis*) et les bigaradiers (*C. aurantium*). Le second pôle regroupe les différents génotypes de pamplemoussiers (*C. grandis*) et les pomélos (*C. paradisi*). Le troisième est formé par les cédratiers (*C. medica*) qui ont sans doute participé à la genèse des limetiers (*C. aurantifolia*) et par récurrence à celle des citronniers (*C. limon*). En effet, les citronniers fortement hétérozygotes et présentant une position intermédiaire entre le groupe des limetiers et celui des mandariniers pourraient être issus d'une hybridation entre ces deux groupes.

L'extension de l'étude à des génotypes plus marginaux valide cette structuration en trois pôles du sous-genre *Citrus* (résultats non publiés). Notons toutefois que le *Citrus halimii* paraît très différent des autres génotypes du sous-genre *Citrus*. Certains représentants du sous-genre *Papeda* se différencient eux aussi assez nettement du sous-genre *Citrus* sans pour autant définir une structure homogène. Ainsi, les données enzymatiques sont conformes à l'organisation autour des trois groupes ancestraux, proposée par Barrett et Rhodes (1976) à partir de l'analyse de 146 caractères morphophysiques. La différenciation entre ces trois groupes est par ailleurs démontrée 1) par les études de brunissement polyphénolique qui permettent de distinguer clairement les mandariniers, les orangers et bigaradiers des autres *Citrus* (Scora, 1975), 2) par l'existence de trois grands types de profils de restriction de l'ADN chloroplastique du sous-genre *Citrus* correspondant aux trois groupes (Green *et al.*, 1986), 3) ainsi que par la diversité de la fraction I des protéines solubles (Handa *et al.*, 1986). De telles corrélations entre ces différents marqueurs et les caractères morphologiques témoignent de forts déséquilibres gamétiques dans le sous-genre *Citrus* et donc de limitations importantes à la recombinaison.

### **Dépression de consanguinité et distorsion de ségrégation : des indices de l'accumulation de mutations défavorables ou délétères ?**

La multiplication végétative masque et autorise l'accumulation, à l'état hétérozygote, de mutations défavorables récessives, normalement contre-sélectionnées dans les populations à multiplication sexuée. Ces mutations peuvent être révélées lors d'un cycle d'hybridation par les distorsions de ségrégation qu'elles entraînent sur tous les loci qui leurs sont liés (sélections gamétique et zygotique), ainsi que par l'importance de la dépression de consanguinité dans les descendance d'autofécondations.

#### *Les distorsions de ségrégation*

Torres *et al.* (1985) avaient constaté chez les agrumes des distorsions de ségrégation sur plusieurs loci enzymatiques, dans la descendance d'un croisement *C. grandis* x *C. jambhiri*. Les ségrégations que nous avons observées pour 7 loci enzymatiques pour 4 croisements confirment l'existence de fréquentes distorsions (résultats non publiés, Tableau 2). Les résultats obtenus sont encore trop fragmentaires pour imputer avec certitude les distorsions à des mutations défavorables. D'autres éléments comme le système d'incompatibilité gamétophytique ou plus généralement les interactions gamétophyte/

gamète sont en effet susceptibles de les avoir générées. C'est pourquoi les études de ségrégation et de recombinaison sont en voie d'être largement développées par le laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'INRA-Bordeaux en collaboration avec la SRA de San Giuliano. L'analyse des ségrégations des fragments de restrictions révélés par une cinquantaine de sondes nucléaires (Luro *et al.*, 1991) devrait ainsi apporter un éclairage nouveau sur les mécanismes de transmission des caractères par voie sexuée, en particulier dans le cadre d'hybridations interspécifiques et intergénériques entre génome de tailles (Figure I) et structures (Nair et Randhawa, 1969) différentes. En effet la présence d'univalents lors de la méiose de nombreux *Citrus* hybrides (Raghuvanshi, 1969), lorsqu'elle n'induit pas une stérilité complète, doit constituer un frein puissant à la recombinaison. Par ailleurs, couplée à la présence d'une mutation délétère ou défavorable, elle est susceptible d'entraîner la contre-sélection d'un chromosome dans son ensemble.

Tableau 2 : Distorsions de ségrégation sur 7 loci enzymatiques

Parents mâles	AAT1	AAT2	MDH1	ICD	PGM1	PGM2	PGI
Rough lemon	N	N	D	D	*	*	N
Lime Brazil Sweet	D	N	D	*	*	N	N
Citron Meyer	D	N	D	D	N	N	N
M. Cléo x C. Carrizo	N	N	N	N	N	N	N

Le parent femelle est toujours le pamplemoussier « sans pépin ». \* : ségrégation non étudiée. N : ségrégation normale. D : distorsion de ségrégation significative (risque de 5 %).

### La dépression de consanguinité

Les différents travaux d'hybridation réalisés dans le monde ont mis en évidence une dépression de consanguinité importante dans les descendance d'autofécondations des cultivars polyembryonnés, tandis qu'elle semble moins marquée pour les cultivars monoembryonnés (Soost et Cameron, 1975). Les résultats que nous avons obtenus dans une descendance de *Citrus volkameriana* (polyembryonné) sont à ce titre exemplaires (Figure 3, d'après Ollitrault et Dubois, 1992). La vigueur des plants de semis d'un an a été estimée par leur coordonnée sur le premier axe d'une Analyse en Composantes Principales (96 % de la variance) appliquée à deux variables (hauteur du plant et diamètre du troisième entre-noeud). Cet index présente une distribution bimodale où le pic de faible vigueur (correspondant à des phénotypes très déprimés) regroupe deux plants tétraploïdes nucellaires et les trois quarts des plants zygotiques (22). Seulement un quart (7) des plants zygotiques est associé aux plants nucellaires dans le pic de forte vigueur. Des ségrégations similaires, bien que moins marquées ont également été observées par Khan et Roose (1988) dans des descendance de *Poncirus trifoliata*. De telles distributions pourraient être associées à l'existence, à l'état hétérozygote, chez *C. volkameriana* et *Poncirus trifoliata*, de plusieurs gènes récessifs indépendants affectant profondément le métabolisme de base.

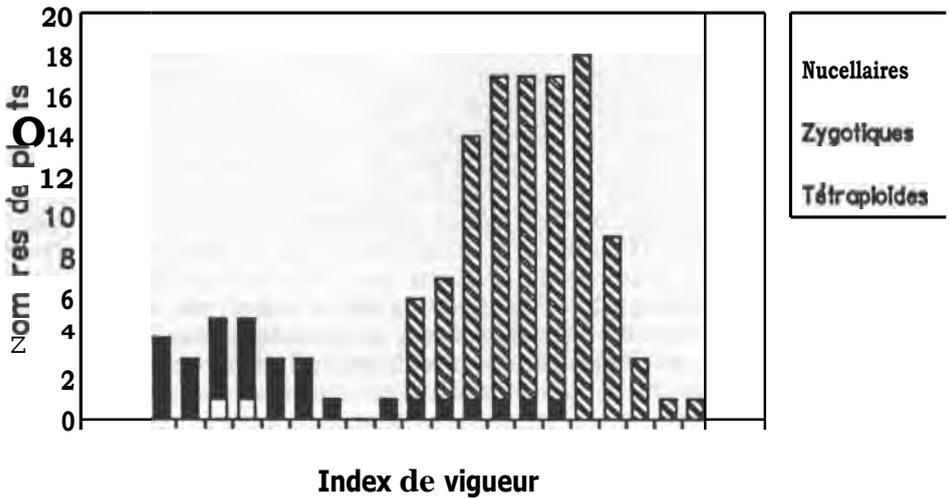


Fig. 3. Dépression de consanguinité dans un semis de *C. volkameriana*.

Ainsi les données dont nous disposons, tant pour ce qui concerne les distorsions de ségrégation que la dépression de consanguinité semblent converger. Elles confortent l'hypothèse de la présence, à l'état hétérozygote, de nombreuses mutations défavorables récessives chez les génotypes polyembryonnés.

## Evolution et domestication des *Citrus*

### Zones d'origine, limitations à la recombinaison, et structuration interspécifique

Si tous les auteurs s'accordent sur une origine des agrumes dans le Sud-Est asiatique, leurs avis sont parfois divergents pour la localisation précise des zones d'origine des différentes espèces. Toutefois les zones de diversité actuelle et les données historiques plaident pour l'existence de trois zones de diversification primaire (Webber, 1967 ; Blondel, note interne INRA ; Scora, 1975) :

—La première zone, couvrant le Nord-Est de l'Inde et les régions adjacentes de Birmanie et de Chine aurait abrité la diversification de *C. medica* et vu apparaître *C. aurantifolia*, *C. limon*, *C. aurantium* et *C. sinensis*.

—L'archipel malais et l'Indonésie constitueraient le centre d'origine de *C. grandis*.

—Les mandariniers (*C. reticulata*), enfin, se seraient diversifiés sur une vaste zone couvrant le Vietnam, la Chine du Sud et le Japon.

La fondation en trois zones géographiques différentes et l'évolution allopatrique de *C. grandis*, *C. medica* et *C. reticulata* suffisent à expliquer la divergence entre ces espèces. La forte structuration de l'ensemble du sous-genre *Citrus* autour de ces trois pôles suggère que les autres «espèces» dérivent de ces trois types de base soit par des hybridations «inter-pôles» soit par des introgressions limitées des *Papeda* ou des genres voisins. La

première région paraît ainsi être la principale zone de diversification secondaire des agrumes cultivés. On y trouve en effet des formes sauvages de *C. aurantium* et *C. aurantifolia* (Kokaya, 1988), de nombreux types hybrides (p. ex., *C. jambhiri*) et également *C. indica*, une forme primitive de mandarinier. Des mandariniers, introduits dans cette région à partir du centre de diversification de Chine, auraient ainsi pu participer à la genèse des « espèces secondaires » par hybridation avec les cédratiers endémiques et sans doute des pamplemoussiers ou des hybrides de pamplemoussiers importés de Malaisie via la Thaïlande. Les données enzymatiques et les profils de restriction de l'ADN chloroplastique commun aux pamplemoussiers, orangers, citronniers, bigaradiers (Green *et al.*, 1986) suggèrent en effet une introgression des pamplemoussiers lors de la création de ces trois dernières espèces.

La forte structuration actuelle indique toutefois que les brassages entre les trois groupes sont restés limités. La polyembryonie, sans doute apportée par le groupe des mandariniers et présente chez toutes les « espèces secondaires », a certainement été un élément déterminant pour limiter la recombinaison. D'autres facteurs, comme la différenciation (structures et tailles) des trois génomes de base a également dû favoriser le maintien des déséquilibres gamétiques sur des portions importantes du génome, voire sur des chromosomes dans leur ensemble. Il semble donc que les trois compartiments de base aient atteint un stade avancé sur la voie de la spéciation.

La diffusion vers le reste du monde s'est ensuite faite lentement. D'après Webber (1967), elle s'est réalisée de la manière suivante : le cédratier fut la première espèce cultivée en Europe (300 ans avant J.-C.). Les citronniers et les orangers, sans doute connus par les Romains, auraient disparu du Bassin méditerranéen lors des invasions barbares, avant d'y être réintroduit définitivement par les Arabes, au XII<sup>e</sup> siècle. La culture du mandarinier en zone méditerranéenne aurait moins de deux siècles. La diffusion vers le continent américain est, pour sa part, postérieure au second voyage de Christophe Colomb. Le pomélo, originaire de la zone antillaise est donc une « espèce » récente.

### Polyembryonie et structures intraspécifiques

Comme l'a démontré Pernès (1984), l'introduction de l'apomixie absolue dans un compartiment conduit inéluctablement à la disparition de la sexualité en l'absence d'une forte sélection en faveur des plants sexués. Chez les agrumes, la polyembryonie induit une apomixie facultative dont le taux résulte de la compétition entre l'embryon sexué toujours présent et les embryons somatiques. C'est a priori un système évolutif intéressant puisqu'il permet à une forme hybride plus vigoureuse que le génotype maternel de voir le jour. Ainsi, le *Poncirus trifoliata* nain « Flying Dragon » très peu vigoureux présente un taux de plants zygotiques avoisinant 50 % tandis qu'il est de l'ordre de 10 % pour les autres *Poncirus* (Roose, 1988 et nos résultats non publiés). Dans un premier stade d'évolution, après l'apparition de la polyembryonie, la population doit donc connaître un progrès génétique avec en particulier une diversification et un rehaussement de la valeur des génotypes polyembryonnés dont la fréquence s'accroît. Toutefois un tel système, en condition de population de taille réduite (îlot en zone forestière)

et en l'absence de sélection disruptive, conduit inéluctablement vers une perte de polymorphisme, donc à la consanguinité des embryons **zygotiques** qui renforce le taux d'apomixie et ce d'autant plus que s'accumulent, à l'état hétérozygote, des mutations récessives défavorables. La population est donc entraînée vers un cul de sac évolutif, où la sexualité aura perdu son potentiel de diversification et de régénération, lorsque la charge génétique sera devenue forte sur les embryons somatiques. La **polyembryonnie** lorsqu'elle a envahi l'ensemble de la population entraîne de plus une inertie évolutive très forte face aux pressions des pathogènes puisque le principal déterminant de l'apparition d'un plan **zygotique** est la vigueur de l'embryon qui n'a aucune raison d'être liée à un caractère de résistance. La **polyembryonnie** apparaît donc à long terme comme un système de reproduction envahissant et suicidaire (Fig. 4).

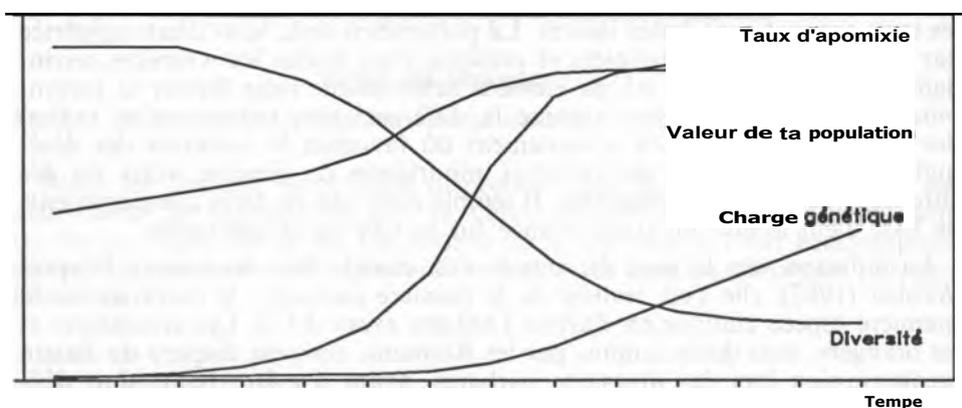


Fig. 4. — Evolution d'une population après l'introduction de la polyembryonnie.

Ce modèle valable pour des populations naturelles d'agrumes est sans doute également applicable aux premiers temps de la domestication avec une propagation par semis et des plantations de très petites populations en bordure des villages. L'évolution des techniques de propagation (bouturage, marcottage et greffage) fait ensuite sortir les cultivars de ce modèle évolutif. En effet, la multiplication végétative permet alors de maintenir des génotypes **monoembryonnés** dans des zones où la **polyembryonnie** est présente. Par ailleurs, la culture de différentes variétés en **sympatrie** est de nature à permettre l'émergence de combinaisons **zygotiques** performantes comme ce fut sans doute le cas pour la clémentine qui aurait été sélectionnée par le père Clément dans un semis de hasard de la mandarine commune (Hodgson, 1967). Enfin, la sélection humaine accentue la diversification **clonale** des cultivars.

Parmi les trois groupes ancestraux, les mandariniers sont les seuls à avoir évolué en présence de la **polyembryonnie**. Celle-ci est prédominante comme le prédisait le modèle précédent. Les cultivars **monoembryonnés** sont ainsi pour l'essentiel des hybrides relativement récents propagés par greffage. Il est cependant évident au vu du polymorphisme enzymatique que la sexualité a joué, initialement, un rôle majeur dans la diversification de ce groupe. La forte **homozygotie** de nombreux cultivars (l'**hétérozygotie** moyenne de l'espèce est en effet rehaussée par le clémentinier et la mandarine Temple qui

sont sans doute issues d'hybridations avec l'oranger), associée à une diversification **intercultivars** suggère que les cultivars actuels sont issus d'une évolution compartimentée. Dans une seconde phase, dans les zones marginales, les mutations naturelles et la sélection humaine ont conduit à une diversification **clonale** parfois importante comme celle des satsumas au Japon ou des clémentiniers dans le Bassin méditerranéen.

La **monoembryonie**, et donc la sexualité, ont sans aucun doute engendré l'important polymorphisme **intercultivars** observé chez les pamplemoussiers. L'**autoincompatibilité** fréquente dans cette espèce a certainement contribué à maintenir une certaine **hétérozygotie** malgré des structures de populations vraisemblablement très similaires à celles des mandariniers (compartimentation et petite taille des populations).

L'absence d'**hétérozygotie** et de polymorphisme **intercultivars**, constatée au niveau enzymatique chez les cédratiers, pourrait s'expliquer par une domestication à partir d'une base génétique restreinte et dans des conditions de consanguinité élevée autorisée par la **monoembryonie** et l'absence d'**autoincompatibilité**.

Les structures **intraspécifiques** des bigaradiers, orangers, pomélos et citronniers (absence de diversité enzymatique **intercultivars** et **hétérozygotie** fixée) montrent clairement que la sexualité n'est pas intervenue lors de la diversification au sein de chacune de ces espèces **polyembryonnées**. Les différents cultivars d'une même espèce sont donc apparus progressivement à partir d'un génotype hybride ancestral par une accumulation de mutations sélectionnées par l'homme. On est donc devant des cas typiques de fausses espèces comme en génèrent souvent les complexes **agamiques**.

L'origine de la diversification dans le groupe des **limetiers** est plus obscure. Ces derniers présentent en effet un certain polymorphisme **intercultivars** et une forte **hétérozygotie**. Ces diverses formes **polyembryonnées** résultent-elles d'hybridations au sein de ce groupe ou dérivent-elles de diverses hybridations **interspécifiques** de même nature ? Les données actuelles sont **insuffisantes** pour trancher.

## Sélection et diploïdie

La très large prédominance des diploïdes chez les agrumes, malgré une aptitude non négligeable à produire des descendants triploïdes ou tétraploïdes, suggère que la **polyploïdie** a joué un rôle négligeable dans leur évolution. Les moindres vigueur (cf. figure 3) et fertilités des tétraploïdes et le désavantage sélectif important qui y est associé sont sans doute des facteurs explicatifs importants. De plus, les cultivars tétraploïdes ont généralement de faibles rendements, une écorce du fruit épaisse et irrégulière (Soost et Cameron, 1975) et présentent donc peu d'intérêt pour la consommation humaine. Les *Citrus* tétraploïdes spontanés ont donc dû être très fortement contre-sélectionnés, tant par la nature que par les **agrumiculteurs**. Par ailleurs, la très grande majorité des tétraploïdes naturels provient de la **polyploïdisation du nucelle** de variétés **polyembryonnées**. Ces tétraploïdes sont donc **polyembryonnés** et fortement **apomictiques** ; le potentiel évolutif du compartiment tétraploïde est ainsi très limité. Les possibilités de couplage avec le compartiment diploïde résident essentiellement dans la pollinisation

de diploïdes sexués par les tétraploïdes. Or, le ratio 3/4 entre les ploïdies de l'embryon et de l'albumen est particulièrement défavorable au développement des pépins (Esen et Soost, 1973). L'émergence de triploïdes spontanés par cette voie est donc également très peu probable. Ainsi, la sélection et le faible potentiel évolutif des compartiments polyploïdes ont dû contrer la tendance naturelle à la polyploïdisation affichée par le système de reproduction des agrumes.

## Conclusions pour la gestion des ressources génétiques et la création variétale

Les trois espèces de base du sous-genre *Citrus*, et plus particulièrement les mandariniers et les pamplemoussiers, qui présentent un important polymorphisme, constituent le principal réservoir génétique pour l'amélioration des cultivars par voie sexuée. Des collections évolutives, *in situ*, préservées de la polyembryonnie, pourraient être envisagées pour les pamplemoussiers afin d'ajuster le génotype des cultivars aux pressions très élevées imposées par les pathogènes. En revanche, dans l'optique d'une banque de gènes, il apparaît peu rentable de conserver une multiplicité de formes des différentes espèces secondaires (orangers, bigaradiers, citronniers, pomélos) qui ont évolué par mutations successives et qui apportent peu de diversité exploitable en recombinaison. Ces différentes formes présentent toutefois de l'intérêt dans le cadre des collections comportementales, pour l'identification et l'exploitation directe de cultivars adaptés à une région donnée.

La polyembryonnie a longtemps limité les travaux d'hybridation chez les agrumes. Si aujourd'hui, le sauvetage d'embryons *in vitro* (Rangan *et al.*, 1969) et la discrimination isoenzymatique des jeunes plants permettent de recouvrer les plants hybrides (Ollitrault et Faure, 1992), la sexualité apparaît, malgré tout, peu adaptée à l'amélioration des espèces secondaires (orangers, citronniers, bigaradiers, pomélos). Il est clair, en effet que leurs caractéristiques spécifiques reposent sur des structures polygéniques complexes, à l'hétérozygotie relativement élevée, conservées par la multiplication végétative ; il est donc très peu probable de retrouver ces structures par la voie sexuée. Par ailleurs, les hybridations intraspécifiques de ces types secondaires s'apparentent, pour l'essentiel du génome, à des autofécondations et doivent donc engendrer une forte dépression de consanguinité. L'amélioration de ces espèces repose donc toujours sur la sélection clonale de mutants spontanés ou induits. Quelques cultivars intéressants ont été créés par hybridations intraspécifiques de mandariniers et de pamplemoussiers ainsi qu'en hybridations interspécifiques mandarinier x pomélo (Hodgson, 1967). Cependant les résultats les plus spectaculaires de la recombinaison sexuée ont été obtenus pour les porte-greffes avec les hybridations intergénériques *Citrus* x *Poncirus*.

La relative médiocrité des résultats acquis par la voie sexuée peut également s'expliquer par la longueur de la phase juvénile, la faiblesse des effectifs analysables compte tenu de l'encombrement, la stérilité de nombreux cultivars élites, mais aussi, pour les hybridations intergénériques, par la différen-

ciation des génomes de base qui a dû limiter les brassages en seconde génération.

Ces différents éléments conduisent de plus en plus les généticiens des agrumes à recourir aux biotechnologies et en particulier à celles associées à l'embryogenèse somatique. En effet, la tendance naturelle à la polyembryonie nucellaire peut être amplifiée *in vitro*. Elle autorise ainsi l'établissement de souches de cals à très fort potentiel embryogène, à partir desquels l'isolement des protoplastes et la régénération de vitroplants sont aisés (Vardi et Spiegel-Roy, 1982). Les premiers transferts de gènes (Kobayashi et Uchimiya, 1989) et de nombreuses fusions somatiques élargissant considérablement les ressources génétiques exploitables (Grosser, 1990) ont ainsi pu être réalisés. L'embryogenèse nucellaire qui a marqué très fortement (parfois négativement) l'évolution et les structures génétiques des agrumes, au niveau interspécifique, intraspécifique et intragénomique est donc une nouvelle fois au coeur des processus de diversification et d'amélioration de agrumes de demain.

### Remerciement

Les travaux de cytométrie en flux ont été réalisés à l'INSERM Montpellier sous la responsabilité de C. Duperray.

## Bibliographie

- ARUMUGANATHAN K. and EARLE E.D., 1991a — Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 9 (3) : 229-233.
- ARUMUGANATHAN K. and EARLE E.D., 1991 — Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 9 : 210-220.
- BARRETT H.C., 1977 — Intergeneric hybridization of *Citrus* and other genera in *Citrus* improvement. *Proc. Int. Soc. Citric.*, 2 : 586-589.
- BARRETT H.C. and HUTCHISON D.J., 1978 — Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*. *Econ. Bot.*, 32 : 27-45.
- BARRETT H.C. and RHODES A.M., 1976 — A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Syst. Bot.*, 1: 105-136.
- CAMERON J.W. and SOOST R.K., 1979 — Sexual and nucellar embryony in F1 hybrids and advanced crosses of *Citrus* with *Poncirus*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 104, 3 : 408-410.
- ESEN A. and SOOST R.K., 1971 — Unexpected triploid in *Citrus*: Their origin, identification and possible use. *J. Hered.*, 62 : 329-333.
- ESEN A. and SOOST R.K., 1973 — Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo : endosperm ploidy ratio in citrus. In *Actos del I congreso mundial de citricultura*, Murcia, Espagne, 2: 53-62.
- FROST H.B. and SOOST R.K., 1968 — Seed reproduction : development of gametes and embryos. In *the Citrus industry*, W. Reuther, L.D. Batchelor and H.J. Webber (eds), University of California Press, 2 : 290-324.

- GREEN R.M., VARDI A. and GALUN E., 1986 — The plastone of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species, and comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.*, 72 : 761-769.
- GROSSER J.W., 1990 — Citrus rootstock improvement by cell fusion. *Citrus and Vegetable Magazine*, 9 : 28-32.
- HANDA T., ISHIZAWA Y. and OOGAKI C., 1986 — Phylogenetic study of fraction I protein in the genus *Citrus* and its close related genera. *Jap. J. Genet.*, 61 : 15-24.
- HEARN C.J., REECE P.C., and FENTON P., 1969 — Self incompatibility and the effects of different pollen sources upon fruit characteristics of four *Citrus* hybrids. *Proc 1st Int. Citrus Symposium* (H. Chapman ed.), Univ. of California Riverside, 1 : 183-187.
- HODGSON R.W., 1967 Horticultural varieties of Citrus. In *The Citrus Industry*, W. Reuther, L.D. Batchelor and H.J. Webber (eds) University of California, Berkeley, 1 : 431-591.
- IWAMASA M., 1966 — Studies on the sterility in the genus *Citrus* with special reference to the seedlessness. *Bull. Hort. Res. Sta. Japan*, Ser. B, 6 : 1-77.
- IWAMASA M. and NITO N., 1988 — Cytogenetics and the evolution of modern cultivated citrus. In *Proc. 6st Int. Citr. Cong.*, Goren and Mendel (eds.), Philadelphia : 265-275.
- IWAMASA M., NITO N. and LING J.T., 1988 — Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily, *Aurantiodeae*. In *Proc. 6st Int. Citr. Cong.*, Goren and Mendel (eds.), Philadelphia : 123-130.
- KOKAYA T.D., 1988 — A synopsis of the genus Citrus (Rutaceae). *Botaniceskij Zurnal*. 73, (6) : 876-885.
- KHAN, I.A. and ROOSE M.L., 1988 — Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in three cultivars of trifoliolate orange. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113 (1) : 105-110.
- KOBAYASHI S. and UCHIMIYA H., 1989 — Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis*) protoplasts by direct DNA transfer. *Jap. J. Genet.* 64 : 91-97.
- KRUG C.A., 1943 Chromosome numbers in the subfamily *Aurantiodeae* with special reference to the genus *Citrus*. *Bot. Gaz.*, 48: 602-611.
- LURO F., LAIGRET F. et OLLITRAULT P., 1991 — Cartographie du génome des agrumes. *Journées agrumes-mangues, IRFA-INRA*, Montpellier.
- NAIR P.K.R. and RANDHAWA G.S., 1969 — Chromosome morphology of the pachytene stage with respect to different Citrus types. *Proc. first Int. Citrus Symp.*, H. Chapman (ed.), Univ. of California Riverside, 1 : 215-223.
- NITO N. and AKIHAMA T., 1990 Prospect of *Citrus* and related genera for disease resistant rootstock. In *Proc. 4 th Int. Asia-Pacific cone on citrus rehabilitation*. FAO-UNDP RAS/86/022 reg. proj. : 39-47.
- OLLITRAULT P. et DUBOIS D., 1992 — Facultative apomixis, spontaneous polyploidisation and inbreeding in *Citrus volkameriana* seedlings. *Congrès EU-CARPIA*, Angers France.
- OLLITRAULT P. et FAURE X., 1992 — Caractérisation des porte-greffe d'agrumes et discrimination des plants de semis zygotiques et nucléaires grâce aux isozymes des feuilles et de l'écorce. *Fruits*, sous presse.
- OLLITRAULT P. et MICHAUX FERRIERE N., 1992 Application of flow cytometry in Citrus breeding. *International congress of citriculture*, Acireale, Italie.
- PERNÈS J., 1984 — *Gestion des ressources génétiques des plantes*, Tome 2. ACCT, Paris, 346 p.

- RAGHUVANSHI S.S., 1969 — Cytological evidence bearing on evolution in Citrus. *In Proc. 1st Int. Citrus Symp.* Chapman (ed), Univ. of California Riverside, 1 : 207-214.
- RANGAN T.S., MURASHIGE T. and BITTERS W.P., 1969 — *In vitro* studies of zygotic and nucellar embryogenesis in citrus. *In Proc. 1st Int. Citrus Symp.* Chapman (ed), Univ. of California Riverside, 1 : 225-229.
- ROOSE M.L., 1988 — Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in Citrus breeding and systematics. *Proc. 6th Int. Citr. Cong.*, Goren and Mendel (eds.), Philadelphie : 155-165.
- SCORA R.W., 1975 — On the history and origin of citrus. In symposium on the biochemical systematics, genetics and origin of cultivated plants. *Bul. Torrey Bot. Club*, 102, 6: 369-375.
- SCORA R.W., 1988 — Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated citrus. *Proc. 6th Int. Citr. Cong.*, Goren and Mendel (eds.), Philadelphie : 277-289.
- SOOST R.K., 1969 — The incompatibility gene system in Citrus. *Proc. 1st Int. Citrus Symposium*. H. Chapman (ed), Univ. of California Riverside, 1 : 189-190.
- SOOST R.K. and CAMERON J.W., 1975 — Citrus. *In Advances in fruit breeding*. J. Janick and J.N. Moore (eds), Purdue University Press : 507-540.
- SWINGLE W.T. and REECE P.C., 1967 — The botany of Citrus and its wild relatives. *In The Citrus Industry*. W. Reuther, L.D. Batchelor and H.J. Webber (eds), University of California, Berkeley, 1 : 190-430.
- TANAKA T., 1961 — *Citrologia* : semi centennial commemoration papers on Citrus studies. *Citrologia supporting foundation*, Osaka, Japan, 114 p.
- TORRES A.M., SOOST R.K. and DIEDENHOFEN U., 1978 — Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. *Amer. J. Bot.* **65**, 8 : 869-881.
- TORRES A.M., MAU-LASTOVICKA T., WILLIAMS T.E. and SOOST R.K., 1985 — Segregation distortions and linkages of Citrus and Poncirus genes. *J. Hered.*, 76 : 289-294.
- VARDI A. and SPIEGEL ROY P., 1982 — Plant regeneration from Citrus protoplasts : variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theor. Appl. Genet.*, 62: 171-176.
- WEBBER H.J., 1967 — History and development of the citrus industry. *In The Citrus Industry*. W. Reuther, L.D. Batchelor and H.J. Webber (eds), University of California, Berkeley, 1 : 1-39.



# **Eléments sur la biologie reproductive d'*Acacia albida* (syn. *Faidherbia albida*) : implications quant à l'organisation de la diversité génétique**

Hélène JOLY

*Résumé* : *Acacia albida* est une légumineuse arborée très importante en agroforesterie en Afrique. Son aire de répartition s'étend du Sénégal au Kenya et en Afrique australe.

Chaque inflorescence regroupe une centaine de fleurs en une grappe compacte, le pollen est une polyade de 32 monades et la pollinisation est entomophile. La floraison est très étalée, à la fois entre les arbres d'une même population et pour un arbre. La dispersion des graines se fait sur des distances considérables car les ruminants sauvages comme domestiques se nourrissent des gousses qui sont indéhiscentes, mais les graines ne sont pas digérées lors du transit intestinal.

L'organisation de la variabilité génétique de cette espèce est donc liée à la fois à des caractéristiques biologiques propres et aux actions humaines à travers la transhumance du bétail et les soins apportés à certains peuplements.

(Article non communiqué).

biol  
de  
genetic  
implications (abida)  
ep- du ive d. facia abp

# Structuration génétique dans le complexe des chênes blancs européens

Rémy PETIT, Antoine KREMER, Roberto BACILIERI,  
Alexis DUCOUSSO, et Anne ZANETTO \*

**Résumé :** Les premières études de l'INRA sur la structuration génétique dans le complexe des chênes blancs européens, qui comprend en France les chênes pédonculé (*Quercus robur*), sessile (*Q. petraea*), pubescent (*Q. pubescens*) et tauzin (*Q. toza*), avaient été encouragées par Jean Pernès. La subdivision de la diversité mesurée à l'aide de différents marqueurs nucléaires ou cytoplasmiques indique qu'une partie très faible de cette diversité différencie les espèces. L'étude des flux de gènes entre espèces, mesurés dans une parcelle mixte (chêne sessile et pédonculé) montre que les échanges se font préférentiellement dans le sens chêne sessile (mâle) x chêne pédonculé (femelle). Nous montrons également que, entre populations, les flux par pollen sont considérablement plus élevés que les flux par gland, d'où l'hypothèse que le chêne sessile a recolonisé son aire de répartition essentiellement par migration du pollen, par hybridation interspécifique avec le chêne pédonculé suivie de rétrocroisements. Cette hypothèse rend compte de la similitude des génotypes cytoplasmiques des deux espèces.

**Mots-clés:** *Quercus*, flux de gènes, hybridation, ADN chloroplastique, isoenzymes, introgression.

**Abstract:** The initial studies by INRA on genetic structure in European white oaks (which are represented by four species in France : *Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens* and *Q. toza*) were encouraged by Jean Pernès. The subdivision of total diversity measured using various nuclear and cytoplasmic genetic markers into its components at the complex of species level indicates that a very small proportion of this diversity distinguishes the species. The study of gene flow between species in a mixed stand shows that there is a unidirectional flow with *Q. robur* as the female and *Q. petraea* as the male parent. We also show that, between populations, seed flow is much lower than pollen flow. Hence the hypothesis that *Q. petraea* colonized its range through long distance pollen migration, by hybridizing local *Q. robur* individuals, followed by backcrosses. This hypothesis accounts for the great similitude between the chloroplast DNA of both species.

\* Laboratoire de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de l'Hermitage, Pierroton, 33610 Cestas, France.

Des botanistes et des évolutionnistes, tels que De Candolle et Darwin au XIX<sup>e</sup> siècle, puis Stebbins (1950), Harper (1961), Van Valen (1976), se sont intéressés au problème de la définition de l'espèce dans le genre *Quercus*. Pour cette raison, jointe au fait que les chênes occupent une place prépondérante dans les écosystèmes forestiers des zones tempérées, ils sont en passe de devenir un modèle pour l'étude et la gestion des ressources génétiques des arbres forestiers, comme en atteste la réussite du récent congrès international sur la génétique des chênes qui s'est tenu en France en septembre 1991 et l'intérêt porté par la CEE à ce thème de recherches.

En France, Jean Pernès a encouragé les premières initiatives du département de recherches forestières de l'INRA portant sur la description des ressources génétiques des chênes sessile *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. et pédonculé *Quercus robur* L. et les travaux ont commencé au sein de son laboratoire à Gif-sur-Yvette en 1986.

Les deux espèces ont une aire de distribution très vaste, et présentent la particularité d'être largement *sympatriques*. Des croisements contrôlés ont montré que ces espèces peuvent s'hybrider (Aas, 1991). Malgré leur niche écologique différente, ces chênes forment fréquemment des peuplements mixtes au sein desquels des individus de morphologie intermédiaire sont présents.

Nous résumerons donc ici les résultats obtenus par notre laboratoire concernant la structuration génétique du complexe d'espèces au niveau *interspécifique*. Ceci à l'aide de différents marqueurs : *isozymes*, ADN *ribosomique*, ADN *chloroplastique*. Puis nous présenterons les résultats d'une étude portant sur les flux de gènes *interspécifiques* au sein d'un peuplement où deux espèces sont présentes en mélange. Enfin nous estimerons l'importance relative des flux de gènes par graine et par pollen et proposerons une hypothèse sur la mise en place des génotypes cytoplasmiques qui rende compte de l'ensemble des résultats observés ainsi que de l'écologie et la dynamique des espèces de chênes.

## Matériels et méthodes

Les procédures techniques ont été détaillées dans les travaux suivants :  
 pour les *isozymes* : Zanetto, 1989, Kremer *et al.*, in press, Zanetto et Kremer, in press, Müller-Starck *et al.*, in press, Kremer et Petit, in press ;  
 — pour l'ADN *chloroplastique* : Kremer *et al.*, in press, Petit *et al.*, in prep. ;  
 — pour l'ADN *ribosomique* : Petit *et al.*, in press.

### Structure de la diversité génétique

La diversité totale pour chaque locus est subdivisée selon un modèle hiérarchique. Développé par Nei (1973, 1977), ce modèle a été étendu depuis à des gènes cytoplasmiques (Birky *et al.*, 1989). La diversité totale peut être subdivisée en une composante *intra-population* (HO et inter-population

(DST)

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

Si les populations peuvent elles-même être regroupées (en espèces taxonomiques dans notre cas) alors  $D_{ST}$  peut être de nouveau divisé en une composante **intra-espèce** ( $D_{SE}$ ) et inter-espèce ( $D_{ET}$ ):

$$D_{ST} = D_{SE} + D_{ET}$$

$$H_T = H_S + D_{SE} + D_{ET}$$

Chacune de ces trois composantes peut être exprimé comme un rapport à la diversité totale :

$$G_S = H_S/H_T, \quad G_{SE} = D_{SE}/H_T, \quad G_{ET} = D_{ET}/H_T, \text{ avec } G_{ST} = G_{SE} + G_{ET}.$$

## Echantillonnage

**Isozymes** : une première étude a porté sur cinq paires de populations de chaque espèce *Q. robur* et *Q. petraea* (quatre en France, une en Allemagne), caractérisées pour quatre loci polymorphes (Kremer *et al.*, in press : étude 1). Dans un deuxième travail (étude 2), dix populations (cinq de chaque espèce) ont été étudiées pour 13 loci polymorphes (Müller-Starck *et al.*, in press, Kremer et Petit, in press).

**Gène de l'A RN ribosomique** : dans une seule population où les deux espèces sont présentes, 29 individus de *Q. robur* et 41 individus de *Q. petraea* ont été étudiés (Petit *et al.*, in press).

**ADN chloroplastique** : 101 populations **monospécifiques** (62 populations de *Q. petraea*, 25 de *Q. robur*, 14 de *Q. pubescens*) ont été échantillonnées (4 à 18 individus par population : Kremer et Petit, in press).

## Flux de gènes entre espèces

**Bacilieri et Ducouso** (in press) décrivent une parcelle de quatre hectares où les chênes sessile (*Q. petraea*) et pédonculé (*Q. robur*) coexistent. Tous les arbres ont été cartographiés et leur génotype **isoenzymatique** étudié (215 individus de *Q. robur* et 191 individus de *Q. petraea*). 160 glands de *Q. petraea* (28 familles de demi-frères) et 133 glands de *Q. robur* (16 familles) ont été également analysés et les fréquences **alléliques** des gènes apportés par le pollen déduites par le modèle de Ritland (1990). Nous considérerons ici six loci pour lesquels l'expression est la même dans les tissus adultes et juvéniles et pour lesquels existent des différences de fréquences **alléliques** entre espèces au stade adulte.

## Importance relative de la migration par pollen et par graine

Nous avons estimé le rapport entre migration par pollen et migration par graine qui, dans un modèle de génétique des populations en île (Wright, 1943), nous donnerait les valeurs de différenciation ( $G_{ST}$  nucléaire et cytoplasmique) observées. Nous faisons les hypothèses que le nombre de populations et leurs effectifs sont constants, que les générations ne sont pas chevauchantes, que les **coefficients** de différenciation ( $G_{ST}$ ) sont à l'équilibre, que la mutation est négligeable devant la migration, et que les chloroplastes

ont une hérédité strictement maternelle. Dans ce cas, nous avons montré (Petit *et al.*, in prep ; formule 11), que :

$$r = m_p/m_s = \frac{L'(L-1) \left[ \frac{1}{G_{STn}} - 1 \right]}{2L(L'-1) \left[ \frac{1}{G_{STc}} - 1 \right]} \quad 2$$

avec  $m$  : migration du pollen,  $m_s$  : migration des graines,  $L$  : nombre de populations échantillonnées pour les marqueurs nucléaires,  $L'$  : nombre de populations échantillonnées pour les marqueurs cytoplasmiques,  $G_{STn}$  et  $G_{STc}$  : coefficients de différenciation pour des marqueurs respectivement nucléaire et cytoplasmique.

## Résultats

### Structure de la diversité génétique

Les résultats pour les *isozymes* (deux études différentes) et pour l'ADN chloroplastique sont donnés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Subdivision de la diversité nucléaire et cytoplasmique selon un modèle hiérarchique. Résultats pour deux études indépendantes pour les *isozymes* : en gras loci communs aux deux études.

Locus	HT	Gs	GET	G <sub>s</sub> E	GET
<b>Isozymes (Etude 1)</b>					
ACP	0,487	0,947	0,048	0,005	0,053
<b>DIA</b>	<b>0,567</b>	<b>0,936</b>	<b>0,047</b>	<b>0,017</b>	<b>0,064</b>
<b>PGI-B</b>	<b>0,241</b>	<b>0,926</b>	<b>0,027</b>	<b>0,047</b>	<b>0,074</b>
<b>PGM-A</b>	<b>0,323</b>	<b>0,843</b>	<b>0,079</b>	<b>0,078</b>	<b>0,157</b>
Valeurs moyennes	0,404	0,913	0,050	0,037	0,087
<b>Isozymes (Etude 2)</b>					
<b>DIA</b>	<b>0,516</b>	<b>0,977</b>	<b>0,002</b>	<b>0,021</b>	<b>0,023</b>
<b>PGI-B</b>	<b>0,195</b>	<b>0,975</b>	<b>0,002</b>	<b>0,137</b>	<b>0,139</b>
<b>PGM-A</b>	<b>0,525</b>	<b>0,962</b>	<b>0,007</b>	<b>0,031</b>	<b>0,038</b>
GOT-B	0,068	0,972	0,007	0,014	0,021
GOT-C	0,301	0,961	0,008	0,031	0,039
IDH-A	0,413	0,961	0,009	0,030	0,039
AP-A	0,640	0,944	0,023	0,036	0,059
MDH-B	0,004	0,993	0,002	0,006	0,008
MDH-C	0,004	0,956	0,013	0,017	0,030
<b>PER</b>	0,666	0,976	0,001	0,022	0,023
6PGD-A	0,076	0,972	0,002	0,024	0,026
6PGD-B	0,093	0,968	0,000	0,032	0,032
SKDH-A	0,131	0,904	0,021	0,075	0,096
Valeurs moyennes	0,280	0,963	0,007	0,037	0,044
<b>ADN chloroplastique</b>	0,657	<b>0,106</b>	0,087	0,807	0,894

En ce qui concerne l'ADN **ribosomique**, un total de onze variants de longueur allèles d'un même gène ont été trouvés au total. Les deux espèces ne diffèrent pas significativement au seuil 5 %. La diversité totale  $Fl_T = 0,829$  n'a donc pas été subdivisée.

### Flux de gènes **interspécifiques**

Les fréquences **alléliques** pour les six loci retenus pour les deux espèces et les deux générations sont données dans le Tableau 2. Seuls les allèles dont la fréquence était supérieure à 0,10 dans au moins une des catégories sont représentés.

Tableau 2: Fréquences **alléliques** du pollen et des arbres adultes pour le chêne sessile (*Quercus petraea*) et pédonculé (*Q. robur*) pour six loci différenciant les deux espèces au stade adulte

Locus	Allèle	<i>Quercus petraea</i>		<i>Quercus robur</i>	
		Pollen	Adulte	Pollen	Adulte
ACP	1	0,55	0,58	0,64	0,79
	2	0,44	0,41	0,36	0,21
AAP	4	0,63	0,60	0,44	0,35
	6	0,21	0,26	0,41	0,47
PGM-A	1	0,11	0,12	0,31	0,47
	3	0,84	0,83	0,62	0,49
LAP	2	0,23	0,30	0,50	0,63
	4	0,76	0,70	0,47	0,36
MR	2	0,72	0,86	0,85	0,90
	4	0,18	0,07	0,08	0,03
IDH-A	1	0,11	0,07	0,00	0,01
	2	0,04	0,05	0,32	0,16
	3	0,80	0,84	0,68	0,74

Les différences entre les cohortes adultes et jeunes sont faibles pour le chêne sessile. A l'opposé, pour le chêne pédonculé, sur les cinq premiers loci .on note une évolution des fréquences **alléliques** en direction du chêne sessile dans le pool pollinique.

### Importance relative de la migration par pollen et par graine

Pour le calcul de  $r = mp/ms$ , nous avons utilisé les **coefficients** de différenciation nucléaire ( $G_{sr}$ ) obtenus par Müller-Starck *et al.* (Etude 2 dans le Tableau 1). Nous n'avons considéré que les loci **suffisamment** variables : les deux loci **MDH** ont donc été exclus. Les  $G_{sr}$  cytoplasmiques ont été calculés sur le même échantillon qu'auparavant soit 62 populations de *Q. petraea* et 25 de *Q. robur*. Les résultats sont donnés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Comparaison des  $G_{ST}$  nucléaires et cytoplasmiques entre chêne sessile et pédonculé et calcul du ratio des coefficients de migration.

<i>Quercus petraea</i>			<i>Quercus robur</i>		
$G_{STn}$	$G_{STc}$	$m_p/m_s$	$G_{STn}$	$G_{STc}$	$m_p/m_s$
0,037	0,908	103	0,017	0,917	258

La différenciation entre espèces ( $G_{ST}$  nucléaire) ainsi que les rapports de migration sont significativement différents (test  $t$  de Student sur séries appariées (11 couples correspondant aux différents loci pour lesquels ces paramètres ont pu être calculés).

## Discussion et conclusion

L'étude de la structuration de la diversité génétique à l'aide de marqueurs **isoenzymatiques** par un modèle de décomposition hiérarchique de la diversité montre que la majeure partie de la diversité réside à l'intérieur des populations. C'est un résultat qui n'est pas propre aux chênes en tant que groupe taxonomique, mais qui caractérise la majorité des espèces ligneuses longévives **allogames** à pollinisation anémophile, à large distribution et formant des populations continues (Hamrick et Godt, 1990 ; Kremer et Petit, in press). Toutefois le fait que les espèces de chênes constituent en fait des complexes d'espèces **interfécondes** contribue sans doute également au maintien d'une diversité élevée.

La diversité qui réside entre espèces est toutefois remarquablement faible : aucun marqueur spécifique n'a été trouvé. Le niveau **interspécifique** représente 5 % de la diversité totale dans l'étude 1 (ce qui reste **suffisant** pour identifier tous les peuplements au niveau spécifique), et seulement 0,7 pour l'étude 2, où la différenciation géographique surclasse largement la différenciation entre espèces. L'intérêt de subdiviser le complexe en « espèces » n'est donc pas évident dans un tel cas (en ce qui concerne du moins les marqueurs **isoenzymatiques**). Il faut noter à ce propos qu'au niveau morphologique, les deux **espèces considérées** ne sont pas également distinctes dans toutes les parties de leur aire où elles sont **sympatriques**. En particulier, dans le nord de l'aire (sud de la Scandinavie, **Ecosse**) existent des populations entières aux caractères morphologiquement intermédiaires (Olsson, 1975, Cousens, 1962).

L'ADN **chloroplastique**, par comparaison aux marqueurs nucléaires, a une très faible partie de sa diversité résidant à l'intérieur des populations : le plus souvent en fait, les populations sont fixées pour l'un des **cytotypes**, dont la distribution est de plus fortement structurée géographiquement. Une comparaison rigoureuse des deux espèces pour la fréquence de leurs **cytotypes** cytoplasmiques montre qu'elles ne diffèrent pas significativement (Petit *et al.*, in prep) : du fait de la forte structuration spatiale, deux populations géographiquement proches partagent le plus souvent un même **cytotype**,

**qu'elles appartiennent ou non à la même espèce.** D'une manière ou d'une autre s'est donc effectué, à de nombreuses reprises, un transfert des génotypes cytoplasmiques entre espèces.

L'ADN **ribosomique**, considéré souvent comme un excellent marqueur spécifique, ne permet pas lui non plus une distinction des espèces pour ces espèces de chênes.

Vu ces résultats, il devenait essentiel de chiffrer les échanges entre espèces. Nos données montrent que dans le cas du peuplement étudié, le pollen fécondant les fleurs femelles de chêne sessile est caractérisé par des fréquences typiques du chêne sessile. Au contraire, le pollen fécondant le chêne pédonculé est caractérisé par des fréquences **alléliques** intermédiaires entre les deux espèces au stade adulte. Il n'y a apparemment, **dans ce sens**, pas ou peu d'obstacles à l'hybridation. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par fécondation artificielle entre ces espèces (**Dengler**, 1941 ; Rushton, 1977 ; Aas, 1988, 1991 ; Steinhoff, in press) qui ont tous noté que le chêne pédonculé est réceptif au pollen du chêne sessile alors que le croisement réciproque échouait le plus souvent. Les échanges semblent donc asymétriques entre ces deux espèces dans les conditions naturelles ou artificielles.

Or l'écologie très contrastée de ces deux taxons est telle que le plus souvent le chêne pédonculé va précéder le chêne sessile dans les successions forestières (Rameau, 1987, 1990, Petit *et al.*, in prep). En effet, le chêne pédonculé est relativement plus pionnier et caractérisé par une bonne aptitude à la colonisation par glands alors que le sessile est plus **climacique**. De plus, lors de la **recolonisation** post-glaciaire, le chêne pédonculé a très certainement précédé le chêne sessile, ce qui se traduit encore aujourd'hui par une distribution légèrement plus nordique du chêne pédonculé.

Enfin, le déséquilibre important entre flux par pollen et par graine chez ces espèces nous a suggéré l'hypothèse suivante : le chêne sessile aurait **recolonisé** son aire de distribution essentiellement par pollen, par hybridation à distance avec le chêne pédonculé suivie de croisements en retour de l'hybride avec le parent pollinique. Une telle hypothèse a été proposée pour une espèce d'*Eucalyptus* en Tasmanie (Potts et Reid, 1988). Cette hypothèse rend parfaitement compte de la distribution observée de l'ADN **chloroplastique** : le chêne sessile assimile ainsi le génome cytoplasmique des populations de chêne pédonculé locales. Il est donc abusif de parler de flux de gènes cytoplasmiques **interspécifiques** (voir par exemple **Rieseberg et Soltis**, 1991) puisque cet échange ne nécessite pas de mouvements significatifs des génomes **chloroplastiques**.

La rapidité de la **recolonisation** post-glaciaire par le chêne pédonculé s'explique bien grâce à l'étroite **coévolution** avec le geai des chênes *Garrulus glandarius* L. (**Bossema**, 1979), son principal agent de dispersion à longue distance (**Ducouso** *et al.*, in press). Cette explication ne peut s'étendre au cas du chêne sessile. La migration par pollen a donc également l'avantage d'expliquer la **recolonisation** rapide du chêne sessile.

**Pernès** (1984) insistait sur l'intérêt de considérer les flux de gènes entre compartiments d'un complexe et de ne plus parler de barrières entre compartiments (espèces taxonomiques dans notre cas) mais de contrôle des flux, **évolutivement** établis et ajustés. Nous pensons qu'une telle explication est particulièrement adaptée dans le cas des échanges asymétriques que nous avons décrit entre espèces de chênes.

## Bibliographie

- AAS G., 1988 — Untersuchungen zur Trennung und Kreuzbarkeit von Stiel — und Traubeneiche (*Quercus robur* L. und *Q. petraea* (Matt.) Liebl.). Univ. München, München, 159 p.
- AAS G., 1991 — Kreuzungsversuche mit Stiel — und Traubeneichen (*Quercus robur* L. und *Q. petraea* (Matt.) Liebl.). *Allg. Forst- u. J-Ztg.*, 162: 141-145.
- BACILIERI R. et DUCOUSSO A. — Some preliminary study on hybridization and mating system in a mixed stand of sessile and pedunculate oak. *Ann. Sci. For.*, in press.
- BIRKY Jr. C.W., FUERST P. et MARUYAMA T., 1989 — Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift : equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 121 : 613-627.
- BOSSEMA I., 1979 — Jays and oaks : an eco-ethological study of a symbiosis. *Behaviour*, 70 : 1-117.
- COUSENS J.E., 1962 — Notes on the status of the sessile and pedunculate oaks in Scotland and their identification. *Scott. For.*, 16 : 170-179.
- DENGLER A., 1941 — Bericht über Kreuzungsversuche zwischen Trauben — und Stieleiche (*Quercus sessiliflora* Smith und *Q. pedunculata* Ehrh. bzw. *Robur* L.) und zwischen europäischer und japanischer Lärche (*Larix europaea*) Mitt. H-Göring-Akad. Deut. Forstwiss., 1 : 87-109.
- DUCOUSSO A., MICHAUD H. et LUMARET R. — Mating system and gene flow in oak species. *Ann. Sci. For.*, in press.
- HAMRICK J.L. et GODT J.W., 1990 — Allozyme diversity in plant species. In Brown, Clegg, Kahler and Weir (eds), *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts : 43-63.
- HARPER J.L., CLATWORTHY J.N., McNAUGHTON I.H. et SAGAR G.R., 1961 — The evolution and ecology of closely related species living in the same area. *Evolution*, 15 : 209-227.
- KREMER A., PETIT R.J., ZANETT A., FOUGÈRE, V., DUCOUSSO A., WAGNER D.B. et CHAUVIN C. — Nuclear and organelle gene diversity in *Q. robur* and *Q. petraea*. In M. Ziehe and G. Müller-Starck (eds), *Genetic variation of forest tree populations in Europe*. Sauerländer, in press.
- KREMER A. et PETIT R.J. — Gene diversity in natural populations of oak species. *Ann. Sci. For.*, in press.
- MÜLLER-STARCK G., HERZOG S. et HATTEMER H.H. — Intra and inter-populational genetic variation in -juvenile populations of *Quercus petraea* and *Q. robur*. *Ann. Sci. For.*, in press.
- NEI M., 1973 — Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70: 3321-3323.
- NEI M., 1977 — F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.*, 41 : 225-233.
- OLSSON U., 1975 — A morphological analysis of phenotypes in populations of *Quercus* (Fagaceae) in Sweden. *Bot. Notiser.*, 128: 55-68.
- PERNÈS J., 1984 — *Gestion des ressources génétiques des plantes*. Tome 2 : Manuel. ACCT, Paris 346 p.
- PETIT R.J. et KREMER A. — Preliminary study of ribosomal RNA gene and chloroplast DNA polymorphisme in a mixed stand of common and sessile oak. *Ann. Sci. For.*, in press.

- POTTS B.M. et REID J.B., 1988 — Hybridization as a dispersal mechanism. *Evolution*, **42** : 1245-1255.
- RAMEAU J.C., 1987 — *Contribution phytoécologique et dynamique à l'étude des écosystèmes forestiers. Applications aux forêts du Nord-Est de la France*. Thèse, Besançon, 344 p.
- RAMEAU J.C., 1990 — Comportement dynamique du chêne pédonculé et du chêne sessile dans les successions forestières. *Rev. For. Fr.*, **42** : 155-164.
- RIESEBERG L.H. et SOLTIS D.E., 1991 — Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evol. Trend. Plants*, **5** : 65-84.
- RITLAND K., 1990 — A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. *J. Hered.*, **81** : 235-237.
- RUSHTON B.S., 1977 — Artificial hybridization between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Watsonia*, **11** : 229-236.
- STEBBINS G.L., 1950 — *Variation and evolution in plants* Columbia University Press, N.Y., 643 p.
- STEINHOFF S. — Results of species hybridization with *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Ann. Sci. For.*, in press.
- VAN VALEN L., 1977 — Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*, **25**: 233-239.
- WRIGHT S., 1943 — Isolation by distance. *Genetics*, **28**: 114-138.
- ZANETTO A. et KREMER A. — Preliminary results of genetic variation between populations of *Quercus petraea* on a range wide scale. *Ann. Sc. For.*, in press.
- ZANETTO A., 1989 — *Polymorphisme enzymatique du chêne sessile (Quercus petraea (Matt.) Liebl.)*. Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France, 42 p.



# Structure génétique et flux géniques dans des peuplements artificiels et naturels de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*)

Daniel PRAT\*

*Résumé* : Des peuplements français de Douglas, essence forestière native de la côte Ouest nord américaine, sont de très bonnes sources de graines. Ces peuplements artificiels, d'origine souvent inconnue, présentent une diversité génétique et une structure génétique, en première approche, semblables à celles des populations naturelles américaines. Toutefois les taux de croisements entre arbres apparentés sont variables ce qui suggère des structures génétiques variées des peuplements artificiels, dues aux effets de fondation. Le peuplement artificiel qui a été établi à partir de quelques descendances, voire d'une seule, fournit des semences de moindre qualité génétique, alors que celui qui provient d'une base génétique plus large produit de meilleures semences. Les flux géniques ont été étudiés dans une population artificielle particulière, un verger à graines. Le flux pollinique provient pour l'essentiel des quelques arbres voisins. Dans les conditions naturelles, les arbres voisins étant souvent apparentés, ceci explique les forts taux de consanguinité observés dans les graines.

*Mots-clés*: *Pseudotsuga*, autofécondation, consanguinité, flux de gènes, introduction d'espèces, pollinisation, mode de reproduction, structure génétique, variabilité, verger à graines.

*Abstract* : Some old French plantations of Douglas-fir, a forest tree species from north-west America, produce genetically good seeds. These artificial stands have generally been planted from unknown provenance ; their genetic diversity and their genetic structure were apparently similar to those of the natural stands in America. Nevertheless the level of crossing between related trees depended on the considered stand, this suggests that the precise genetic structure of the artificial stands are variable and may result from the foundation effects. The artificial stand established from few, maybe only one, progenies produced the genetically worse seed crop, while the larger genetic-basis stand produced the best seed crop. Gene flows have been analysed in a peculiar artificial stand : a clonal seed orchard. The pollen received on one tree came essentially from few near pollinator trees. In natural stands, neighbouring trees are often related trees and a local pollen flow results in a high level of consanguinity of seeds.

\* Laboratoire **INRA-ENGREF** de Recherche en Sciences Forestières, Unité de Génétique des Populations d'Arbres Forestiers, 14 rue Girardet, 54042 Nancy cedex, France.

## Introduction

Le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) est une essence forestière résineuse, originaire de la côte Ouest nord-américaine et introduite en Europe depuis le milieu du siècle dernier. C'est depuis plusieurs années la principale essence de reboisement en France (18 millions de plants produits par an ; Bastien *et al.*, 1986). L'intérêt porté par les forestiers à cette espèce provient en grande partie de sa croissance rapide (exploitation possible à 50-60 ans ; Arbez, 1987 ; Riou-Nivert, 1989) et de la bonne qualité de son bois (Polge, 1963). Ainsi l'enjeu économique justifie le programme d'amélioration génétique dont le Douglas fait l'objet (Christophe et Birot, 1983 ; Bastien *et al.*, 1986 ; Bastien et Roman-Amat, 1990). Celui-ci doit aboutir à la production de plants de reboisement génétiquement meilleurs que les plants actuellement utilisés.

Les essais comparatifs de provenances réalisés en France ont révélé l'existence d'une grande variabilité génétique dans l'aire naturelle pour les caractères d'adaptation et de croissance (Rosette, 1986). De bonnes origines ont été définies dans les Etats de l'Oregon et de Washington. Des peuplements français, plantés et suffisamment âgés pour produire des graines en quantité, ont été aussi testés dans les mêmes dispositifs comparatifs de provenances et se sont avérés être, pour certains d'entre eux, de très bonnes sources de semences, parmi les toutes meilleures (Rosette, 1986 ; Arbez, 1987).

L'objet de la présente étude est la recherche d'une explication de la bonne qualité génétique des peuplements artificiels au niveau de leur variabilité génétique ou de leur structure génétique. Trois hypothèses non exclusives peuvent rendre compte de la bonne qualité de ces peuplements artificiels : 1) les origines (souvent inconnues) des peuplements artificiels étaient situées dans les meilleures régions de provenances aujourd'hui disparues ou non prospectées ; 2) une génération de sélection a suffi à améliorer considérablement la qualité génétique du peuplement ; 3) les arbres mères voisins situés dans les peuplements artificiels sont généralement non apparentés et il en résulte un niveau de consanguinité très faible dans les descendance qui se traduit par un regain de vigueur, d'autant plus que plusieurs provenances ont pu être mélangées.

Trois peuplements artificiels et une population naturelle sont étudiés. De plus les flux géniques, polliniques, ont été abordés dans un peuplement où les génotypes de tous les individus étaient connus, il s'agissait d'un verger à graines de clones. Les analyses de polymorphisme sont conduites à l'aide des isoenzymes.

## Matériel et méthodes

Une population de Douglas, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, de l'aire naturelle a été prospectée (Bacon Creek : Etat du Washington, 48° 36'N, 121° 23'W) ainsi que trois peuplements en Europe (Au Charnay : France, 46° 18'N, 4° 25'E ; En Argaud : France, 46° 18'N, 4° 30'E ; Barlohe : Alle-

magne, 54° 09'N, 9° 38'E). Les graines de 20 à 39 arbres par peuplement ont été récoltées par descendance séparées. Les graines récoltées sur chacun des clones du verger à graines de Bout (France, Allier) et de trois arbres de génotype particulier de ce verger sont disponibles pour l'étude des flux polliniques.

Les graines imbibées pendant 48 heures dans de l'eau sont disséquées. Chaque tissu (les graines comportent deux tissus génétiquement différents : l'embryon diploïde, et l'endosperme de même génotype que le gamète femelle) est broyé séparément dans le tampon d'extraction (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, KCl 25 mM, saccharose 29 mM). La migration a lieu dans un système continu de tampon (Tris 90 mM, acide orthoborique 90 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,4) dans des gels de polyacrylamide. Quatre systèmes enzymatiques sont révélés (selon Conkle *et al.*, 1982) et correspondent à 7 locus analysés (Li et Adams, 1989) :  $\alpha$ -estérase (E.C. 3.1.1.1), glucose-6-phosphate déshydrogénase (E.C. 1.1.1.49), leucine aminopeptidase (E.C. 3.4.11.1), et malate déshydrogénase (E.C. 1.1.1.37). Dix graines de chaque arbre récolté ont été analysées pour déterminer son génotype.

Les paramètres décrivant le polymorphisme génétique et sa structuration sont déterminés chez les arbres mères et leur descendants (en ne considérant qu'un seul descendant par arbre mère). La variabilité génétique entre les peuplements étudiés est estimée par le paramètre  $G_{ST}$  (Nei, 1973) déjà utilisé chez le Douglas par Li et Adams (1989). L'importance de la variabilité génétique est estimée aux différents niveaux de variation (individu, descendance, provenance, population totale) par une décomposition hiérarchisée des variances obtenues à l'issue d'une analyse factorielle des correspondances faite sur les données alléliques. Les taux d'allofécondation sont estimés par la méthode multilocus développée par Ritland (1986) en utilisant les génotypes complets de tous les embryons analysés, ou, dans le cas du verger à graines, d'après la fréquence des gamètes mâles porteurs de l'allèle marqueur présent uniquement chez l'arbre mère ; 500 graines par arbre ont alors été analysées (Prat et Caquelard, 1991). Les variations des indices de fixation observées dans les peuplements artificiels et naturels entre les deux générations analysées (arbre mère et embryon) sont supposées entièrement dues à l'autofécondation et aux croisements entre arbres apparentés, ce qui permet d'estimer la fréquence des croisements entre arbres apparentés (Prat et Arnal, en préparation).

Les flux géniques ont été estimés dans le verger à graines car la caractérisation de tous les clones permettait l'identification d'une partie des gamètes et donc la localisation des arbres pollinisateurs correspondants. Les arbres proches, jusqu'à 35 mètres (au-delà de cette distance très peu de pollen participe à la pollinisation ; Erickson et Adams, 1990) des trois arbres récoltés sont considérés comme pollinisateurs potentiels. L'abondance de pollinisation et les génotypes des arbres pollinisateurs permettaient l'estimation des fréquences alléliques polliniques autour de l'arbre récolté (Prat et Caquelard, en préparation). Le groupe d'arbres effectivement pollinisateur est estimé en recherchant la meilleure concordance entre les fréquences polliniques de ce groupe d'arbres et celles des gamètes mâles ayant fécondé ; la circulation du pollen est considérée anisotrope ou privilégiée selon une direction comme cela a déjà été mis en évidence chez le pin maritime par Baradat *et al.* (1984).

## Résultats

### Variabilité génétique

Un seul des 7 locus analysés (MDH-2) n'est pas polymorphe dans toutes les stations étudiées. Les fréquences **alléliques** ne présentent pas de variations significatives entre les peuplements, les allèles majeurs aux différents locus, sauf LAP-1, sont les mêmes pour les 4 populations. Les fréquences **alléliques** polliniques sont identiques aux fréquences **alléliques** déterminées chez les arbres mères. Les descendance ont un nombre moyen d'allèles par locus réduit dans tous les cas (Tableau 1).

Tableau 1 : Variabilité génétique de trois peuplements artificiels et d'une population naturelle de Douglas

Peuplement Pays Génération	Au Charnay France		En Argaud France		Barlohe Allemagne		Bacon Creek Etats-Unis	
	M	D	M	D	M	D	M	D
Locus polymorphes	6/7	6/7	6/7	6/7	7/7	6/7	6/7	6/7
Nombre moyen d'allèles	3,0	2,9	3,3	3,1	3,4	3,1	3,0	2,9
<b>Hétérozygotie</b> attendue	0,34	0,36	0,42	0,42	0,38	0,37	0,36	0,38
<b>Hétérozygotie</b> observée	0,33	0,27	0,47	0,35	0,39	0,32	0,37	0,32
Indice de fixation	0,01	0,23	-0,08	0,17	-0,01	0,13	-0,01	0,15

M : Arbre mère ; D: Descendant (un seul par descendance).

Les peuplements d'En Argaud et Barlohe présentent une variabilité génétique (taux d'**hétérozygotie** attendu) sensiblement plus élevée que les deux autres. Cependant, dans le peuplement de Barlohe (celui dont l'effectif est le plus élevé : 39 ; au maximum 25 pour les autres), la diversité **génotypique** semble plus faible puisqu'il présente 5 paires d'arbres mères de mêmes génotypes. Tous les génotypes des arbres mères des autres peuplements étaient uniques. Les taux d'**hétérozygotie** attendus sont semblables entre génération alors que les taux d'**hétérozygotie** observés sont plus faibles chez les descendants.

### Structuration de la variabilité génétique

La variabilité génétique **interpeuplement**  $G_{ST}$  est faible et ne représente que 2,6 % de la variabilité génétique totale. Néanmoins cette valeur correspond à une part importante, plus de la moitié, de la variabilité génétique **interpopulation** de l'aire naturelle du Douglas vert, la variété la plus plantée en Europe. L'analyse hiérarchisée faite d'après les résultats de l'analyse factorielle des correspondances ainsi que d'autres méthodes confirmer cette valeur. L'essentiel de la diversité génétique (58 %) est observé au niveau **intradescendance**, quel que soit le peuplement, le reste (39 %) entre descendance d'un même peuplement.

## Système de reproduction et structure génétique intrapeuplement

La structure génétique intrapeuplement des arbres mères est peu marquée et présente un très faible excès d'hétérozygotie, sauf pour le peuplement d'Au Charnay (Tableau 1). Il n'y a pas de variation significative entre les locus. Les taux d'hétérozygotie observés chez les descendants sont inférieurs à ceux attendus : les indices de fixation moyens sont significatifs, le locus LAP-1 présente les effets les plus marqués.

Les indices de fixation significatifs observés chez les descendants peuvent résulter d'autofécondation, aussi celle-ci estimée en moyenne dans les peuplements se révèle très variable selon la station (Tableau 2). Elle est plus fréquente à Au Charnay que dans le peuplement naturel, un taux de 5 % d'autofécondation en condition naturelle est conforme aux résultats publiés. L'allogamie reste toutefois largement prépondérante.

Les taux d'autofécondation observés dans les peuplements naturel et artificiels (Tableau 2) ne rendent pas compte de la totalité des variations d'indice de fixation entre les arbres mères et les embryons (Tableau 1). En considérant que la seule autre source de variation de ces indices entre générations est l'existence de croisements entre arbres apparentés (supposés demi-frères), les taux de croisements estimés entre arbres apparentés sont alors variables d'un peuplement à l'autre (Tableau 2). Les écarts entre les taux d'autofécondation monocus et multocus supportent également l'existence de croisements entre arbres apparentés.

Tableau 2: Régime de reproduction dans les peuplements artificiels et naturel de Douglas

Peuplement	Au Charnay	En Argaud	Barlohe	Bacon Creek
Taux d'autofécondation multocus	0,20 ± 0,09	0,07 ± 0,08	0,15 ± 0,08	0,06 ± 0,05
monocus	0,31 ± 0,10	0,17 ± 0,11	0,25 ± 0,08	0,21 ± 0,07
Taux de croisement entre arbres apparentés	0,48	0,90	0,30	0,56

Dans la population naturelle, près de 56 % des croisements sont entre arbres apparentés. Le peuplement d'En Argaud présente un fort taux de croisements entre arbres apparentés, ce peuplement pourrait être constitué de quelques, voire d'une seule, descendance malgré son polymorphisme plutôt plus important que dans les autres peuplements. Les peuplements d'Au Charnay et de Barlohe montrent des taux de croisements entre arbres apparentés plus faibles que la population naturelle, ils peuvent résulter d'un mélange de descendance d'une ou plus vraisemblablement plusieurs provenances de l'aire naturelle. La bonne qualité génétique des semences récoltées dans le peuplement d'Au Charnay proviendrait alors de croisements entre arbres d'origines variées, ce qui se traduit par de l'hétérosis et la bonne performance des descendance.

Les taux d'autofécondation individuels de quelques arbres porteurs d'allèles rares ont été estimés en verger à graines. Deux clones porteurs d'allèles rares très faciles à identifier ont été choisis pour déterminer les taux

d'autofécondation. Les allèles rares sont tous trouvés à l'état hétérozygote, la distance entre deux arbres du même clone est supposée suffisante, au moins pour les ramets retenus, pour négliger les pollinisations entre ramets du même clone. Les graines de deux ramets d'un même clone porteur de deux allèles rares différents ont été analysées pour les deux systèmes enzymatiques correspondants (les génotypes de chaque graine ont été déterminés pour les deux locus considérés). Les deux ramets de ce clone présentaient les mêmes taux d'autofécondation (4 %), mais l'un des locus est inexploitable car l'allèle rare correspondant était significativement désavantagé, surtout lors de la transmission pollinique. Le ramet d'un autre clone porteur d'un autre allèle rare, dont la transmission était désavantagée uniquement par le gamète femelle, avait un taux d'autofécondation de 2,3 %. Les valeurs observées dans ce verger à graines sont inférieures à celles observées en peuplements forestiers. La floraison des différents clones était particulièrement synchrone l'année de récolte dans ce verger à graines, ce qui favorise un meilleur brassage des flux géniques polliniques.

Le verger à graines de Bout est d'une bonne qualité génétique, les graines qui y sont récoltées fournissent des plants parmi les plus vigoureux au stade de la pépinière. Le taux d'hétérozygotie attendu qui est une mesure de la variabilité génétique du peuplement est plus faible que dans les stations précédemment étudiées : 0,320. Le taux d'hétérozygotie observé est de 0,305, ce qui conduit à une structuration génétique relativement forte pour le Douglas :  $F = 0,047$ . Les clones introduits dans le verger de Bout proviennent de différentes stations françaises et peuvent être originaires de diverses populations de l'aire naturelle du Douglas. Les clones sélectionnés présentent toutefois un excès d'hétérozygotie ( $F = -0,135$ ) en considérant individuellement leur peuplement français d'origine.

Les deux stations étudiées qui fournissent des descendants vigoureux (Au Charnay et le verger à graines de Bout) présentent un sensible excès d'homozygotie des arbres mères, mais dans un cas au moins cet excès d'homozygotie par rapport à l'équilibre panmictique provient de la structuration en sous-populations de ce peuplement, ces sous-populations présentent de plus un excès d'hétérozygotie. La même structuration est possible dans le peuplement d'Au Charnay s'il résulte de descendance récoltées dans plusieurs provenances.

## Flux géniques

Le nuage pollinique ayant pollinisé un arbre est significativement différent des génotypes des arbres du voisinage. Les décalages phénologiques étant très faibles et les arbres très florifères, cette source de variation ne peut pas être responsable, pour l'année de récolte, des effets observés. La prise en compte de l'intensité de floraison ou de la distance entre arbres pollinisés et pollinisateurs ne réduit pas l'écart entre les fréquences polliniques observées et attendues.

La dissémination du pollen serait assez homogène dans une zone variant de 15 à 30 mètres selon l'arbre. Toutefois, les écarts entre les fréquences observées et attendues restent très significatifs. L'étude des génotypes polliniques révèle que des arbres éloignés peuvent avoir une plus forte contribution que des arbres proches. Dans chaque cas, les allèles du nuage

pollinique qui étaient présents en excès provenaient d'un côté de l'arbre étudié. La dissémination du pollen autour d'un arbre abordée jusqu'ici de façon isotrope doit l'être en considérant une direction privilégiée de dispersion. A cet effet, une déformation en ellipse du nuage pollinique a été appliquée. La prise en compte de cette orientation améliore considérablement l'estimation du nuage pollinique. Les plus faibles écarts sont observés pour une direction privilégiée (similaire pour les trois arbres étudiés) qui est celle des lignes de plantation, et avec un sens bien défini, en provenance de l'Ouest, direction des vents dominants. Dans ce verger à graines, le pollen reçu par un arbre provient essentiellement d'une direction donnée et sous un angle assez fermé (de  $n/10$  à  $n/4$ ). Le nombre d'arbres pollinisateurs est alors réduit et peut être estimé à moins d'une dizaine. Ces résultats rendent compte de l'absence de pollinisation par des arbres même proches et très pollinisateurs comme l'a révélé une analyse multilocus. Le vent lors de la pollinisation est probablement la principale source de déformation du nuage pollinique.

## Discussion et conclusion

L'origine des peuplements artificiels est difficile à définir en raison de la faible structuration de la variabilité chez le Douglas. Diverses espèces de conifères et de feuillus ont une structuration faible de la variabilité génétique révélée par les isoenzymes (rarement plus de 10 % de variabilité interpopulation), la variabilité intrapopulation est très importante chez les arbres. Est-ce en rapport avec leur longévité, les régimes de reproduction étant variés ?

La structure des peuplements artificiels n'est pas différente de celle des populations naturelles. L'ampleur de la variabilité génétique y est semblable et fluctue davantage entre peuplements artificiels. Les effets de fondation de ces peuplements semblent prépondérants. L'étude des populations introduites en France est donc très utile tant pour la conduite des programmes d'amélioration génétique (recherche de croisements entre provenances) que pour la gestion des ressources génétiques du Douglas. Le brassage génétique de diverses provenances de Douglas semble une bonne voie pour produire des semences de très bonne valeur génétique.

Une première génération d'influence humaine chez cette espèce forestière ne semble pas affecter profondément la diversité génétique. Cependant, la sélection semble en faveur des individus les plus hétérozygotes, comme dans les conditions naturelles. Les taux d'hétérozygotie observés des arbres âgés sont généralement plus élevés que ceux attendus sous l'hypothèse de la panmixie comme Szmidt et Muona (1985) l'ont déjà montré, la sélection favorisant les individus hétérozygotes. La première génération de « domestication » du Douglas est davantage conditionnée par le nombre de géniteurs récoltés pour la constitution d'une plantation.

Dans le cas de *Cryptomeria japonica*, la variabilité génétique était plus forte dans les peuplements artificiels mais ceux-ci présentaient une diversité interpeuplement réduite par rapport à celle des populations naturelles (Tsu-

**mara et al.**, 1989). La sylviculture **clonale** traditionnelle au Japon en est certainement responsable du fait de la plantation d'un nombre réduit de clones fortement hétérozygotes.

Les régimes de reproduction étudiés dans les peuplements de Douglas ont révélé une allogamie prépondérante et un taux élevé de croisements entre arbres apparentés. L'utilisation des allèles rares ne semble pas la meilleure voie pour estimer les taux d'autofécondation. De nombreux allèles rares seraient contre-sélectionnés selon Bush et Smouse (1990), ils peuvent être liés génétiquement à des caractères adaptatifs. Une approche **multilocus** est alors préférable.

Les flux polliniques limités à un petit groupe d'arbres et la faible dissémination des semences favorisent les croisements entre arbres proches qui sont souvent apparentés. La sélection en faveur des individus les plus hétérozygotes élimine la plupart des descendants consanguins : l'apparementement prépondérant est de type demi-frère. Brunel et Rodolphe (1985), dans une population naturelle d'épicéa, avaient ainsi trouvé des relations d'apparementement, essentiellement de type demi-frère, qui affectaient approximativement la moitié des individus.

### Remerciements

Cette étude a été réalisée dans le cadre du GIS Variétés forestières améliorées et en collaboration très étroite avec la station d'amélioration des arbres forestiers du Centre INRA d'Orléans. J.C. Bastien et B. Roman-Amat doivent être vivement remerciés pour leur contribution.

## Bibliographie

- ARBEZ M., 1987 — *Les ressources génétiques forestières en France. I. Les conifères.* INRA-BRG, Paris, 236 p.
- BARADAT P., MARPEAU A. et BERNARD-DAGAN C., 1984 — Les terpènes du pin maritime : aspects biologiques. VI. Estimation du taux moyen d'autofécondation et mise en évidence d'écarts à la **panmixie** dans un verger à graine de semis. *Ann. Sci. For.*, **41**: 107-134.
- BASTIEN J.C. et ROMAN-AMAT B., 1990 — Predicting Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) volume at age 15 with early traits. *Silvae Genet.*, **39** : 29-35.
- BASTIEN J.C., ROMAN-AMAT B. et MICHAUD D., 1986 — Douglas. *Rev. For. Fr.* **38** (n° sp) : 113-120.
- BRUNEL D. et Rodolphe F., 1985 — Genetic neighbourhood structure in a population of *Picea abies* L. *Theor. Appl. Genet.*, **71** : 101-110.
- BUSH R.M. et Smouse P.E., 1990 — Evidence for the adaptative significance of **allozymes** in forest trees. In : *International symposium on population genetics of forest trees.* Oregon State University, Corvallis (sous presse).
- CHRISTOPHE C. et BIROT Y., 1983 — Genetic structure and expected genetic gains from **multitrait** selection in wild populations of Douglas-fir and Sitka spruce. II. Practical application of index selection on several populations. *Silvae Genet.*, **32** : 173-181.

- CONKLE M.T., HODGSKISS P.D., NUNNALLY L.B. et HUNTER S.C., 1982 — Starch gel electrophoresis of conifer seeds : a laboratory manual. *USDA Forest Service, Pacific SW Range Experiment Stn., Gen. Tech. Rep. PSW-64*. 18 p.
- ERICKSON V.J. et ADAMS W.T., 1990 — Mating system variation among individual ramets in a Douglas-fir seed orchard. *Can. J. Forest Res.*, **20** : 1672-1675.
- LI P. et ADAMS W.T., 1989 — Range-wide patterns of allozyme variation in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Can. J. Forest Res.*, **19** : 149-161.
- NEI M., 1973 — Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 3321-3323 (1973).
- POLGE H., 1963 — Contribution à l'étude de la qualité des principales essences résineuses exotiques utilisées dans les reboisements français. *Ann. Ecole Nat. Eaux Forêts Stn. Rech. Exp.*, **20** : 403-469.
- PRAT D. et CAQUELARD T., 1991. — Estimation of selfing rate in a Douglas-fir seed orchard by means of rare alleles. *In : Biochemical markers in the population genetics of forest trees*. Edited by S. Fineschi, M.E. Malvotti, F. Cannata and H.H. Hattemer, SPB Academic Publish. by, The Hague : 235-236.
- RIOU-NIVERT P., 1989 — Douglas, qualités du bois, élagage et sylviculture. *Rev. For. Fr.*, **41** : 387-410.
- RITLAND K., 1986 — Joint maximum likelihood estimation of genetic and mating structure using open-pollinated progenies. *Biometrics*, **42** : 25-43.
- ROSETTE C., 1986 — Contribution à l'exploration de la variabilité infraspécifique du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco). INRA, Orléans — ENITEF, Nogent-sur-Vernisson, 136 p.
- SZMIDT A.E. et MUONA O., 1985 — Genetic effect of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) domestication. *In : Population genetics in forestry*. Edited by Gregorius H.R. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.: 241-252.
- TSUMARA Y., Tomaru N. et Ohba K., 1989 — Allozyme variation of natural and artificial stands of *Cryptomeria japonica* in Japan. *In : Proceedings 6th international congress of Sabrao* : 833-836.



# La domestication de l'igname (*Dioscorea* sp.) : Conséquences pour la conservation des ressources génétiques

Perla HAMON \*, Jeanne ZOUNDJIHEKPON \*\*, R. DUMONT \*\*\*  
et Bakary TIO-TOURE \*\*

*Résumé* : La domestication des plantes à multiplication végétative est très mal connue. Chez l'igname, on considère que l'évolution des formes sauvages se serait faite à la suite de mutations somatiques, c'est-à-dire par le jeu du hasard. Or, notre connaissance (sur le terrain) du matériel végétal et les études de diversité génétique conduisent à proposer un processus de domestication dans lequel les mécanismes de recombinaison sont très importants. La sélection serait pratiquée en deux temps : le cueilleur choisit des plantes à partir des caractères aériens et en récolte le tubercule puis, parmi ceux-ci, il choisit ceux qui seront multipliés. Ce processus pourrait avoir deux conséquences majeures : Sous réserve de bien « connaître » les géniteurs disponibles, des schémas de sélection par voie sexuée peuvent être utilisés pour l'amélioration **variétale**. La conservation des ressources génétiques surtout statique est très pratique mais **insuffisante**. La conservation pérenne *in situ* par la gestion d'espaces naturels dans lesquels co-évoluent formes sauvages et cultivées est possible mais reste à définir

*Mots-clés*: igname, domestication, évolution, conservation, ressources génétiques.

*Abstract* : Few data are available about the domestication of vegetatively propagated crops. The domestication of yams from wild species is supposed to be a random process according to the rate of somatic mutations. In fact, the knowledge of genetic diversity and agricultural practices lead us to propose the following traditional selection where the genetic recombination plays a great role. Firstly, the gatherer identifies plants on the basis of aerial morphological characters ; secondly, he harvests the tubers and within this stock, selects those for planting. Two main consequences arise from that process : With a good knowledge of progenitors, it is possible to define breeding schemes for **african** yams ; The *in situ* perennial conservation of genetic resources could be planned but the detailed procedure must be improved.

*Key words*: Yams, domestication, evolution, genetic resources, conservation.

\* AGETROP, CIRAD/IRAT, BP 5035, 34032 Montpellier cedex, France.

\*\* Laboratoire de Génétique, Université d'Abidjan, 22 BP 582, Abidjan 22, Côte-d'Ivoire.

\*\*\* IDESSA, BP 635, Bouaké, Côte-d'Ivoire.

## La domestication des ignames

D'une manière générale, on sait peu de choses sur la domestication des plantes à tubercules. Les raisons invoquées sont le plus souvent le manque de données archéologiques (les tubercules, de par leur nature, ne se prêtent pas à la conservation à long terme) et de documents écrits (surtout pour le continent africain). Néanmoins, on a tendance à considérer que les plantes à multiplication végétative constituent des cultures anciennes, reliques d'une agriculture primitive (Sauer, 1952 *in* Heiser, 1969, Plucknett, 1976). La domestication de telles plantes est un processus évolutif lent et graduel, contrairement au changement brusque observé au cours de la « révolution néolithique » (Harris, 1967).

La domestication des ignames africaines, selon Murdock (1959), ferait suite à l'introduction voici 2 000 ans, des plantes du complexe malaisien (taro, banane, etc.). Pour Chevalier (1910), Burkill (1960) et surtout Coursey (1967), cette domestication aurait débuté voici 5 000 ans, sous l'influence de la culture des plantes à graines, mil et surtout sorgho. Mais cette « agriculture » n'a pu se mettre en place que parce qu'une protoculture de l'igname existait déjà.

Hormis cet aspect chronologique de la domestication, l'aspect évolutif a été essentiellement abordé par la formulation d'hypothèses sur les origines sauvages des ignames cultivées africaines du complexe *D. cayenensis-rotundata* ; la plupart des auteurs et notamment Coursay (1972) considérant que le passage sauvage-cultivé n'a eu lieu que par l'intervention des mutations somatiques.

Dans ce qui suit, nous nous proposons de :

- préciser la notion cultivée-sauvage chez l'igname ;
- proposer un processus de domestication qui rende compte de la diversité génétique observée chez les formes cultivées et sauvages ;
- analyser les conséquences pour la conservation des ressources génétiques.

### Formes sauvages et cultivées : signification chez l'igname

Parler de domestication sous-entend qu'on soit capable de différencier une forme sauvage d'une forme cultivée. Chez certaines plantes, la différence d'aspect est telle que des noms scientifiques différents ont été donnés : citons par exemple le maïs, le blé ou le mil. Chez l'igname, la différence d'aspect peut être subtile et la distinction quelquefois subjective, fonction de l'observateur.

Barrau (1967) écrit à ce propos « ...il est encore difficile d'établir une distinction toujours précise entre plantes simplement cueillies ou ramassées, plantes assistées ou protégées et plantes cultivées ». Faute de critères objectifs de jugement, nous avons adopté devant le « fait accompli » les distinctions suivantes :

- igname sauvage : toute forme se développant naturellement dans son site d'origine sans aucune assistance ni aucun soin particulier ;

—igname protégée : toute forme se développant dans son site d'origine mais faisant l'objet de soins particuliers et d'une récolte régulière sans dommage pour la plante (tête du tubercule maintenue) ;

—igname cultivée : toute forme déplacée de son site d'origine, faisant l'objet de soins particuliers pour son développement et de récolte régulière.

Au niveau du cueilleur, la différence cultivée-sauvage se situe sur un autre plan. D'un côté, il reconnaît et nomme différemment chaque ensemble de formes morphologiquement semblables (chaque espèce), rencontré dans son milieu naturel. Mais il s'agit d'une reconnaissance globale de l'espèce dans le sens où il n'a pas besoin de différencier les individus au sein des « espèces ». De l'autre côté, il apprend à reconnaître et à identifier une à une les plantes qu'il a déplacé de leurs lieux naturels de développement. Cette **protoculture**, telle qu'elle était déjà pratiquée voici 5 à 10 000 ans, ne nécessitait pas réellement de préparation du terrain, mais selon Davies (1968), se faisait déjà en buttes. C'est la première phase de la domestication de l'igname.

### La diversité des formes cultivées en Afrique de l'Ouest

La variabilité **morphophysiolgique** observée au sein des formes cultivées du complexe *D. cayenensis-rotundata* apparaît telle que Martin et Sadik (1977) estimaient leur nombre entre 500 et 2 500. L'étude de matériel collecté essentiellement en Côte-d'Ivoire (Hamon et Ahoussou, 1988), a permis de définir et de décrire 20 groupes **variétaux** (Hamon, 1988) dont 18 sont en culture en Côte-d'Ivoire (Hamon et al., 1986). Le polymorphisme enzymatique chez les formes cultivées (Hamon et Touré, 1990 a, b) et chez les formes sauvages (Hamon et Touré, 1991) ainsi que des dénombrements chromosomiques effectués chez 10 groupes **variétaux** (Zoundjhekon et al., 1990) permettent au sein des formes cultivées de proposer la structure génétique de la figure 1. Quatre espèces sauvages sont à l'origine des formes cultivées mais deux (*D. praehensilis* et *D. abyssinica*), ont conduit à la plus grande partie. L'origine sauvage de 3 groupes **variétaux** (**hexaploïdes**) reste toujours méconnue. Un groupe **variétal**, Yaobadou, apparaît clairement comme un hybride **interspécifique** *D. praehensilis* x *D. burkilliana*.

Les conséquences de cette structure sont très importantes à 4 niveaux :

- Chaque clone peut correspondre à une situation génétique particulière. C'est le cas du groupe **variétal** « Gnan », appartenant à la même classe génétique que les tétraploïdes (à partir des caractères enzymatiques) et qui s'est révélé **hexaploïde** ;

- La taxonomie botanique, telle qu'elle était perçue jusque-là prend un autre sens :

- une espèce, *D. cayenensis* selon Chevalier (1936), Burkill (1939), Miège (1968), Dumont (1977), Martin et Rhodes (1978),

- deux espèces *D. cayenensis* et *D. rotundata* (Burkill, 1921-1960 ; Akoroda et Chheda, 1983 ; Onyilagha et Lowe, 1986),

*D. cayenensis-rotundata* est un complexe génétiquement hétérogène, regroupant l'ensemble des formes cultivées ouest-africaines à feuilles entières (contrairement à *D. dumetorum*), non **bulbifères** (à l'opposé de *D. bulbifera*). La tige n'est jamais ailée contrairement à *D. alata*, ni pubescente contrairement à *D. esculenta* ;

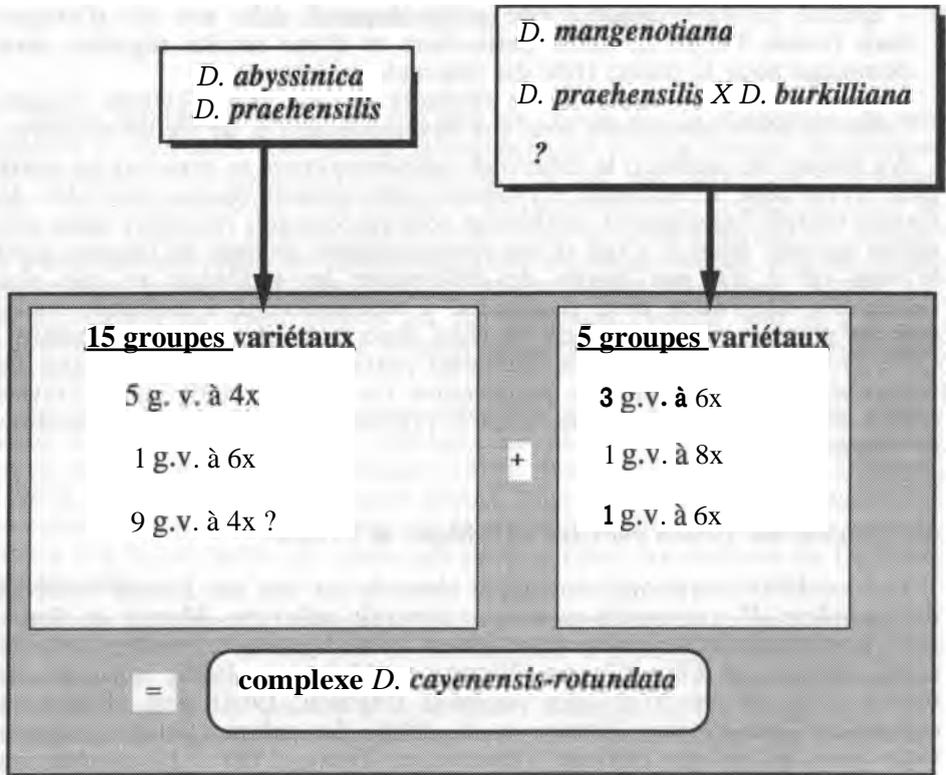


Fig. 1. Structure génétique du complexe *D. cayenensis-rotundata*.

- L'amélioration **variétale** par voie sexuée ne peut ignorer cette hétérogénéité génétique au risque de se vouer à l'échec. Les différents programmes de sélection mis en place en Afrique de l'Ouest dès les années 1960 (Waite, 1963 ; Doku, 1967) n'ont conduit à ce jour à aucune variété sélectionnée ;
- Des événements très différents peuvent être à l'origine des formes cultivées : — intervention de gamètes non réduits hybridation interspécifique — sélection convergente sélection locale de mutants somatiques.

Le rôle, supposé prépondérant, des mutations somatiques dans la formation des ignames cultivées (Coursey, 1967 ; Léon, 1976) mérite donc d'être reconsidéré. Une réflexion sur un processus probable de domestication pourrait fournir aux sélectionneurs modernes des indications non négligeables pour l'élaboration de programmes d'amélioration **variétale**.

### Le processus de domestication des ignames

L'action de domestication nécessite la possibilité de multiplier à volonté une plante donnée (connaissance des modes de reproduction) et de choisir c'est-à-dire sélectionner les plantes à multiplier. Chez les plantes à graines, les cueilleurs ont dû « découvrir » le lien entre graines et plantes. Cette découverte était capitale. La multiplication végétative à partir du tubercule

chez l'igname est quasiment une évidence. Les tubercules de par leur nature sont des organes aptes à la conservation à court terme. Au cours de cette conservation, il peut y avoir germination et émission d'une tige sans qu'il y ait eu plantation. Ceci se produit avec des tubercules entiers mais aussi avec les fragments de tubercules non consommés (généralement les têtes de tubercules) et jetés aux abords des habitations.

Constater la reproduction conforme liée à la multiplication végétative nécessitait sans doute plus d'attention peut-être que celle que les femmes portent naturellement dans les choix faits pour les différentes préparations culinaires. Remarquer qu'un fragment de tubercule à chair jaune donne une plante dont le tubercule est à chair jaune, c'était avant l'heure, constater la conformité de la multiplication végétative. Ce faisant, les cueilleurs se donnaient les moyens de multiplier toute plante présentant pour eux un quelconque intérêt. Cette conformité bien sûr est acquise aux mutations somatiques près. Celles-ci ont d'autant plus de chances de se produire qu'un génotype est présent en un grand nombre d'exemplaires. Elles seront maintenues et constitueront un clone si cela résulte d'une volonté délibérée du cultivateur. Par conséquent, ces mutations somatiques doivent conduire à des modifications visibles par le cultivateur et suscitant son intérêt. Il est **difficilement** concevable qu'une mutation somatique non repérable de visu puisse conduire à un clone et donc être multipliée par le simple hasard (et ce à chaque cycle de plantation).

Mais parallèlement à cette multiplication végétative délibérée du cueilleur, se produit tout naturellement de la reproduction sexuée. Est-elle exploitée et comment ? Selon **Zohary** (1984), peu de cycles sélection-recombinaison sont nécessaires pour aboutir aux formes cultivées chez les plantes à multiplication végétative. En fait, peu de cycles seront nécessaires si peu de gènes et des gènes liés sont impliqués dans le syndrome de domestication. Par contre, le temps nécessaire pour la réalisation de ces cycles sera beaucoup plus long que chez les plantes à graines car les cycles de recombinaison-sélection ne sont pas calés sur les cycles de plantation. En effet, selon **Pernès** (1983), la phase de sélection chez les plantes à graines est directement liée à l'activité de cueillette. Une fois le processus de « sélection » enclenché, le cultivateur est pris dans un engrenage car, il ne peut pas, faute d'avoir à tout recommencer, ne pas « choisir », à chaque cycle de plantation, les graines à semer. Il en est tout autrement chez les plantes à multiplication végétative, car le cultivateur peut prendre tout son temps pour faire son choix ; le mode de reproduction utilisé lui assurant la conformité d'une génération à l'autre.

Mais, si la sélection est un choix délibéré du cultivateur, a-t-il les moyens de faire un choix « raisonné » ? Chez les plantes à graines, les graines sont à la fois l'organe de reproduction et de consommation. La sélection est donc directe. Chez l'igname, faire de la sélection sur les graines est inconcevable, car il est impossible au sein d'une espèce de prédire les caractères d'une plante à partir de celles de la graine dont elle est issue. De plus, il aurait fallu que ces nouveaux cultivateurs aient fait le lien entre graine et plante. Ce n'était pas évident a priori. La sélection a donc dû porter sur les plantes elles-mêmes ; mais alors, sur quelle partie de la plante ? Par réflexe, on est tenté de dire : sélection sur le tubercule. En fait, l'observation des formes cultivées montre que, contrairement à toute attente, leur appareil végétatif aérien est très différent de celui des espèces sauvages. Pour nous,

bien que l'appareil aérien ne soit apparemment d'aucun usage, la sélection a d'abord porté sur cette partie de la plante. Après récolte des tubercules correspondants, une deuxième sélection a lieu en choisissant les tubercules à planter. La raison est d'ordre pratique : la cueillette de tubercules d'igname est coûteuse en temps et en énergie.

Ces nouveaux cultivateurs, capables de distinguer les espèces sauvages les unes des autres à partir de leur morphologie aérienne ont tout naturellement utilisé les caractères aériens en tant que marqueurs de ceux du tubercule. Progressivement, au cours de leurs choix successifs, ils ont favorisé le maintien de types aériens très particuliers, correspondant à des caractéristiques bien spécifiques de tubercules. Les événements survenus au cours de la domestication, permettant de rendre compte de l'obtention du complexe *D. cayenensis-rotundata* sont schématisés sur la figure 2.

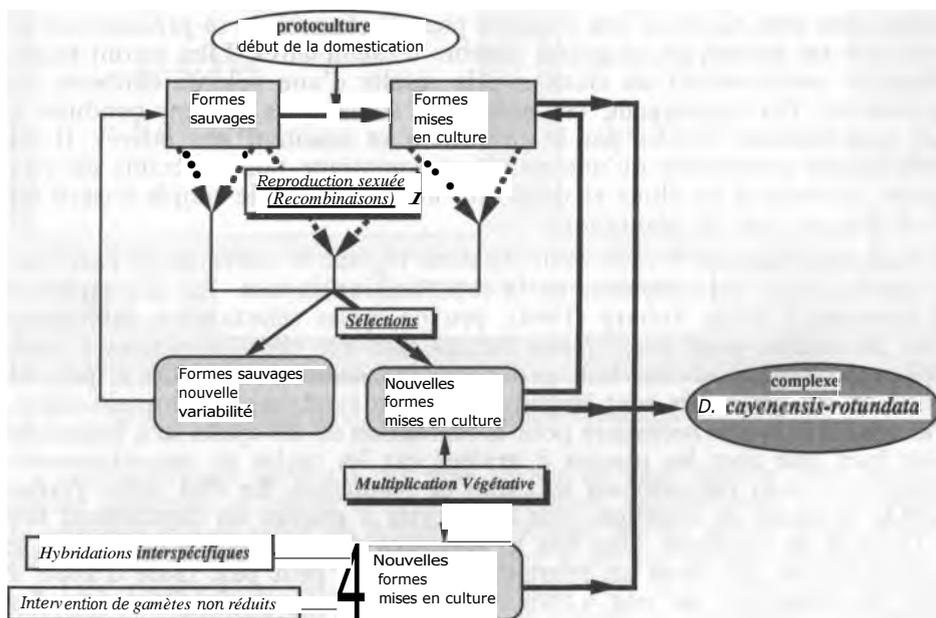


Fig. 2. Formation du complexe cultivé *D. cayenensis-rotundata*.

## Conséquences pour la conservation des ressources génétiques

### Les dispositifs actuels de conservation

Dans la majorité des cas, les collections d'ignames cultivées sont vivantes, multipliées en champ et récoltées chaque année. Même si elles sont très souvent confondues avec les collections de travail, elles sont très coûteuses en main-d'oeuvre, entretien et temps-chercheur. De plus, elles sont sujettes à de très nombreuses pertes (tubercules blessés à la récolte, pertes lors de

la conservation, non levée, etc.). En l'espace de 10 ans, 80 % des échantillons peuvent être perdus. C'est inacceptable. D'autre part, ce type de collection est statique, or les formes cultivées constituent dans leur aire d'origine des systèmes évolutifs complexes en raison de leur aptitude à utiliser les voies de reproduction sexuée et végétative. Enfin, en règle générale, ces collections sont dépourvues de formes sauvages.

Depuis une quinzaine d'années, certaines institutions ont pu développer la conservation par **microbouturage** *in vitro*. Ce mode de conservation est très attrayant chez l'igname et offre comme pour les autres plantes de très nombreux avantages (manipulation plus aisée, gain de place, diffusion, etc.). Cependant, une mise au point technique est souvent nécessaire car toutes les espèces, tous les génotypes ne réagissent pas de la même manière au **microbouturage** *in vitro*.

Enfin, **Pernès** (1981) s'interroge à juste titre : « Les cultures somatiques variées, partent-elles de génomes non changés, non modifiés ? » Chez l'igname, les études de biologie moléculaire ne sont pas **suffisamment** avancées pour répondre à cette question. Néanmoins, nous avons pu constater (données non publiées) que même après plusieurs années de **microbouturage** *in vitro*, les **zymogrammes** obtenus après électrophorèse **d'isozymes** demeurent inchangés en passant de l'état *in vivo* à l'état *in vitro*. De plus, les teneurs en ADN (évaluées par **cytométrie** en flux) des échantillons maintenus *in vitro* sont compatibles avec les dénombrements chromosomiques effectués sur les échantillons *in vivo* (**Hamon et al.**, soumis à *Can. J. Bot.*).

Sans pouvoir autant conclure à l'absence totale de modifications de génomes, ceci pourrait indiquer que les « perturbations » révélées par la mise en culture *in vitro* ne devraient pas être plus importantes que celles obtenues *in vivo*. En fait, chez l'igname on utilise habituellement la voie végétative pour sa multiplication. Par conséquent, on peut imaginer que le comportement de la plante n'est pas profondément modifié. L'étude de plantes multipliées (à grande échelle) *in vitro* pourrait sans doute apporter des informations sur les mutations somatiques (fréquence, modifications induites...).

### Une conservation *in situ*

Très récemment, la Côte d'Ivoire a mis en place un dispositif de conservation en milieu naturel, alliant à la fois un écosystème forestier et **savani-côle**. La collection est maintenue pérenne tant pour les formes sauvages (*in situ* et importées) que pour les formes cultivées. De telles collections pérennes *in situ* conduisent en théorie à une limitation des pertes, mais dès à présent, elles posent un problème d'ordre pratique : comment « gérer » les différentes espèces ou « groupes » de plantes ?

En effet, l'équilibre existant au moment de la mise en place de la collection risque d'être rompu par :

- l'introduction de génotypes nouveaux (nouvelles combinaisons **alléliques**, structures **génotypiques** issues de la reproduction sexuée, vitesses de colonisation différentes selon les espèces...);
- une protection excessive conduisant à l'arrêt de toute sélection humaine, or celle-ci s'exerce depuis des millénaires.

Quel doit donc être le devenir d'une telle collection pérenne ? Doit-elle être statique comme la collection *in vivo* en offrant l'avantage d'un coût d'entretien global réduit ? Doit-elle être évolutive ? Dans ce cas, les modalités de gestion seront très importantes à définir.

### Une situation de « meilleur compromis »

Une collection d'ignames se doit de comporter l'ensemble des formes cultivées et une représentation des espèces sauvages. Concernant les premières, on dispose aujourd'hui de moyens techniques **suffisamment** performants pour pouvoir identifier les clones et n'avoir à conserver que des génotypes différents. Ceci peut être fait par la conservation *in vitro*. Mais on pourrait également développer les techniques d'embryogenèse somatique et procéder à une cryoconservation en azote liquide. Les espèces sauvages pourraient être conduites comme des cultivées à condition de bien maîtriser l'échantillonnage.

Parallèlement à ces conservations statiques, on pourrait imaginer le maintien d'équilibres « naturels » en zones proches des cultures. Ces milieux sont ouverts à l'homme, l'homme-cueilleur, l'homme-cultivateur mais fermés à l'homme-industriel, « l'homme-trop moderne ». Dans ces espaces se crée et se recrée cette variabilité que l'on peut exploiter par la multiplication végétative. Mais les cultivateurs de demain ressembleront-ils à ceux d'hier ? Auront-ils les mêmes préoccupations ? Qui pourrait les blâmer d'aspirer à un confort plus moderne et ce faisant de faire disparaître l'originalité de l'igname : conservation conforme et évolution simultanées ? Les responsables de la préservation des ressources génétiques ne devront-ils pas apprendre à se substituer à ces cultivateurs traditionnels ?

### Remerciements

Nous remercions M. Jean-Louis Noyer (CIRAD) pour les discussions lors de la rédaction et Mme Maryse Guizot (CIRAD) pour la frappe de ce manuscrit.

## Bibliographie

- AKORODA M.O. and CHHEDA H.R., 1983 — **Agro-botanical** and species relationships of guinea yams. *Trop. Agric.* (Trinidad), 60-4 : 242-248.
- BARRAU J., 1967 — De l'homme cueilleur à l'homme cultivateur : l'exemple océanien. *Cahiers d'histoire mondiale. Vol. X, n° 2* : 275-292.
- BURKILL I.H., 1921 — The correct botanical names for white and yellow Guinea yams. *Gardn's Bull. Straits Settl.*, 2-12: 438-441.
- BURKILL I.H., 1939 — Notes on the genus *Dioscorea* in the Belgian Congo. *Bull. Jard. Bot. Etat Brux.*, 15 : 345-392.
- BURKILL I.H., 1960 — The **organography** and the evolution of the *Dioscoreaceae*, the family of the yams. *J. Linn. Soc. (Bot)*, 56 (367) : 319-412.
- CHEVALIER A., 1910 — Sur les *Dioscorea* cultivés en Afrique tropicale et sur un cas de sélection naturelle relatif à une espèce spontanée dans la forêt vierge. Extrait du *Bull. Soc. Nat. Acclim. Fr.* : 1-5.

- CHEVALIER A., 1936. Contribution à l'étude de quelques espèces africaines du genre *Dioscorea*. *Bull. Mus. Hist. Nat.*, Paris, 2e sér. 8 (6) : 520-551.
- COURSEY D.G., 1967 — *Yams*. London, Longmans Green.
- COURSEY D.G., 1972 — *The origins and domestication of yams in Africa*. Paper prepared for Symposium : Origin of African Plant Domesticates — non publié.
- DAVIES O., 1968 — Origins of African Agriculture. 1. The origins of Agriculture in West Africa. *Current Anthropology*, 9-5 : 479-482.
- DOKU E.V., 1967 — *Root Crops in Ghana*. *Proc. of the Intern. Symp. on Trop. Root Crops*, Trinidad : 39-65.
- DUMONT R., 1977 — Etude morpho-botanique des ignames *Dioscorea rotundata* et *Dioscorea cayenensis* cultivées au Nord-Bénin. *Agronomie Tropicale*, XXXII-3 : 225-241.
- HAMON P., 1988 — *Structure, origine génétique 'des ignames du complexe Dioscorea cayenensis-rotundata et domestication des ignames en Afrique de l'Ouest*. Thèse de doctorat ès-Sciences-Paris-Sud, Orsay, 1987, Orstom éd., TDM n° 47.
- HAMON P. and AHOUSSOU N., 1988 — Les ignames (*Dioscorea* spp.) de Côte d'Ivoire : bilan de trois prospections effectuées dans les régions Centre, Nord-Ouest, Centre-Ouest et Est. *Plant Genetic Resources Newsletter*, n° 72 : 20-23.
- HAMON P., HAMON S. and TOURE B., 1986 — *Les ignames du complexe Dioscorea cayenensis-rotundata de Côte-d'Ivoire. Inventaire et descriptions des a cultivars » traditionnels*. IBPGR/FAO éd., Rome, Italie.
- HAMON P. and TOURE B., 1990 a — Characterization of traditional yam varieties belonging to the *Dioscorea cayenensis-rotundata* complex by their isozymic patterns. *Euphytica*, 46: 101-107.
- HAMON P. and TOURE B., 1990 b — The classification of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata* complex) of West Africa. *Euphytica*, 47: 179-187.
- HAMON P. and TOURE B., 1991 c — New trends for yam improvement in the *Dioscorea cayenensis-rotundata* complex. In *Crop Genetic Resources of Africa*. Vol. II. N.Q. Ng, P. Perrino, F. Attere and H. Zedan (eds).
- HARRIS D.R., 1967 — New light on plant domestication and the origins of agriculture. *Geogr. Rev.*, 57-1 : 90 — 107.
- HEISER C.B. Jr., 1969 — Some considerations of Early Plant Domestication. *Bio Science*, 19-3 : 228-231.
- LEON J. 1976 — *Origin, Evolution, and Early Dispersal of Root and Tuber Crops*. *Proc. of the fourth Symp. Intern. Soc. Trop. Root Crops*. Colombia. Cock, Mac Intyre and Graham (eds).
- MARTIN F.W. and RHODES A.M., 1978 — The relationship of *Dioscorea cayenensis* and *D. rotundata*. *Trop. Agric. (Trinidad)*, 55-3 : 193-206.
- MARTIN F.W. and SADIK S., 1977 — Tropical yams and their potential. Part. 4 : *Dioscorea rotundata* and *Dioscorea cayenensis*. *Agricultural Handbook* n° 502.
- MIEGE J., 1968 — *Dioscoreaceae* in : *Flora of Tropical West Africa*. 2nd ed., Hepper ed., London, 3/1 : 144-154.
- MURDOCK G.P., 1959 — *Africa: its people and their culture history*. New York: Mc Graw-Hill.
- ONYILAGHA J.C. and LOWE J., 1986 — Studies on the relationships of *Dioscorea cayenensis* and *Dioscorea rotundata* cultivars. *Euphytica*, 35 : 733-739.
- PERNÈS J., 1981 — Ressources génétiques des plantes et biologie moléculaire. *Le sélectionneur français*, 29 : 63-66.
- PERNÈS J., 1983 — La génétique de la domestication des céréales. *La Recherche* n° 146 (juillet-août) : 910-919.

- PLUCKNETT D.L., 1976 — Edible aroids. In : *Evolution of crop plants*. N.W. Simmonds (ed), Longman, London.
- WATTS A.W., 1963 — Yams. *Dioscorea* spp. *Field Crop Abstr.*, 16-3 : 145-157.
- ZOHARY D., 1984 — Modes of evolution in plants under domestication. In : *Plant Biosystematics*. W.F. Grant (ed), 579-586.
- ZOUNDJIHEKPON J., ESSAD S. and TOURE B., 1990 — Dénombrement chromosomique dans dix groupes variétaux du complexe *D. cayenensis-rotundata*. *Cytologia*, 55 : 115-120.

# Les cultivars de manioc au Congo

Jean-Marcel MINGUI \*, V. BAMA \*, V et J. MABANZA \*\*

**Résumé:** Première culture vivrière du pays, le manioc (*Manihot esculenta*) fait l'objet depuis 1976, date de l'apparition des grands fléaux (bactériose *Xanthomonas campestris* PV *Manihoti* et cochenille *Phenacoccus Manihoti*), d'une attention particulière au Congo. Le tubercule frais, bouilli, ou transformé (*chikouangue*, fofou) est la principale forme de consommation. Les feuilles constituent également un légume très apprécié. Les travaux réalisés depuis une quinzaine d'années par le programme national de recherches sur le manioc ont permis la mise en place des collections de travail, la sélection du matériel résistant ou tolérant aux fléaux et adapté à diverses écologies du pays, la mise en place d'un programme d'amélioration. La grande variabilité des ressources génétiques disponible devrait permettre aux programmes d'amélioration en cours d'obtenir des résultats plus intéressants.

**Mots-clés:** *Manihot*, *Xanthomonas*, cultivars, clone, ressources génétiques, *Epidinocarsis*.

## Introduction

Situé à cheval sur l'équateur, le Congo couvre une superficie de 342 000 km<sup>2</sup> pour une population de 2 000 000 d'habitants dont 289 600 d'actifs agricoles. Le pays jouit d'un climat équatorial à subéquatorial avec des précipitations annuelles allant de 1 200 à 2 000 mm d'eau selon les régions. En général, le pays est caractérisé par une longue saison des pluies, d'octobre à juin, accusant en janvier et février un ralentissement plus ou moins marqué et une saison sèche de 2 à 3 mois.

Deux types de végétation se partagent le Congo : la forêt et la savane (respectivement 60 % et 40 % de la superficie totale). La forêt de terre ferme est la plus étendue. On la trouve dans le Congo sud-occidental mais également, largement dans le Nord. L'aspect le plus courant de la savane est celui qui comporte un étage herbacé plus ou moins grand et un étage arbustif.

\* Centre de Recherches Agronomiques (CRAL) BP 28 Loudima, Congo.

\*\* LAP/CV: Laboratoire d'Amélioration des Plantes et de Cultures *in vitro*, DGRST/ORSTOM BP 2499, Brazzaville.

Les sols du Congo sont le résultat d'une évolution très ancienne qui altère le sol sur une épaisseur considérable. De leurs caractéristiques découlent en grande partie les possibilités agricoles. On distingue ici les sols ferrallitiques typiques ou terres à cacao ; du Nord-Ouest, les sols ferrallitiques lessivés des pays Batékés ou du plateau côtier, les sols faiblement ferrallitiques du sud-ouest du Congo et les sols hydromorphes de la majeure partie de la cuvette alluviale du Congo.

Malgré des diversités écologiques importantes et même ethniques, on retrouve partout les principales cultures vivrières du pays qui sont le manioc, la banane, l'igname, l'arachide, le maïs, etc. Le manioc constitue cependant la première culture vivrière et la principale source de calories. La plante couvre 2/3 des superficies cultivées. Sa consommation moyenne sous forme de féculent (foufou ou chikouangue) par tête d'habitant et par an est estimée à 175 kg dans les villes et 425 kg à la campagne.

## Contraintes au développement de la culture du manioc

Les conditions du développement de la culture du manioc au Congo sont apparemment favorables. Néanmoins, la pauvreté des sols, les systèmes de cultures archaïques, la pénibilité du travail, les problèmes liés à la transformation et les maladies constituent les contraintes majeures limitant l'optimisation de la production du manioc. C'est à la résolution de ces problèmes que s'attelle depuis plusieurs années le Programme National de Recherches sur le Manioc, mis en place en 1975 suite aux importantes attaques de bactériose (*Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis*) et de cochenille (*Phenacoccus manihoti*) survenues au Congo au début des années 70.

## Programme national de recherches sur le manioc

Il est structuré autour des axes tendant à parvenir à une meilleure connaissance du matériel végétal, améliorer la production et la productivité du manioc, assurer une protection efficace de la culture contre les principaux fléaux (maladies et ravageurs), améliorer les modalités d'utilisation alimentaire, assurer un meilleur transfert de technologies adaptées en milieu paysan. Il s'agit des axes de recherches suivantes :

1. Sélection — Amélioration
2. Agronomie
3. Entomologie
4. Phytopathologie
5. Transformation, Technologie, Nutrition.

Les travaux des quatre premiers axes de recherches constituent l'essentiel de ce document.

## Sélection et l'amélioration du manioc au Congo

### Prospections et introductions

Débutées en 1976 et financées successivement par le Congo, le FAC, le CRDI et l'IITA, elles ont permis de mettre en place 2 principales collections de travail ; celle de Loudima avec un millier d'accessions et celle d'Odziba en zone de forte pression de bactériose et de mosaïque avec plus de 100 accessions. Cette collection comprend des cultivars locaux auxquels il faut ajouter du matériel introduit sous formes de graines (IITA), de vitropants (IITA), de boutures ou clones (Nigéria, Togo, Côte d'Ivoire, Zaïre, Kenya).

### Description du matériel

La caractérisation du matériel est loin d'être achevée. Elle se borne jusqu'à présent à une description morphologique. Les critères utilisés jusqu'à ce jour sont ceux relatifs à la taille, à l'architecture de la plante, à la forme, à la coloration et aux dimensions de certains organes aériens ou souterrains. Une fiche descriptive a été mise au point mais elle nécessite d'être complétée. Une description enzymatique est prévue dans le cadre d'un projet en cours d'exécution. Par rapport au travail déjà effectué, les remarques suivantes peuvent être faites :

#### *Architecture des plantes*

Il existe au Congo du matériel rampant très ramifié et du matériel érigé peu ou non ramifié. Entre ces 2 formes extrêmes, on trouve toute une gamme de formes. Les relations entre écologie et architecture de la plante ne sont cependant pas clairement établies. Le choix du matériel par le paysan est plutôt guidé par le type d'agriculture. On trouvera du matériel rampant là où la monoculture du manioc est prédominante (zone des plateaux Batékés) et du matériel érigé là où la culture associée prédomine ( Bouenza). Ici, le manioc est cultivé en association avec le maïs, les courges, l'arachide.

Les habitudes alimentaires ne sont pas également étrangères au choix du type de matériel. Les variétés érigées sont souvent caractérisées par des feuilles larges. Elles constituent le gros du matériel végétal dans les zones à forte consommation de feuilles de manioc pilées ou broyées ( Saka-Saka), aliment qui constitue un apport substantiel de protéines.

En terme de productivité, il n'a pas été observé de différence fondamentale entre le matériel érigé et le matériel rampant. D'après nos observations et pour des raisons de besoin en lumière et d'étouffement des mauvaises herbes, les variétés rampantes se seraient développées en savane et les variétés érigées en forêt.

#### *Caractéristiques des organes*

La description des feuilles s'est faite sur la base de la couleur. Celle des jeunes feuilles va du marron au violet et celle des vieilles feuilles du vert tendre au vert foncé. La couleur des pétioles varie du vert jaunâtre au rouge

foncé, celle des tiges adultes du pourpre cendré au brun cuivré en passant par le marron. Quant aux jeunes tiges, elles sont de couleur vert foncé ou vert tendre avec parfois des rayures colorées de rouge Bordeaux.

La racine tubérisée a été décrite selon sa forme, sa longueur et son diamètre. La forme va de conique à cylindrique. La longueur varie de 30 cm à plus d'un mètre et le diamètre à maturité de 5 à 10 cm. La racine a été également décrite selon la couleur de sa chair. Celle-ci peut être de couleur jaune ou blanche.

#### *Autres critères de description*

Le matériel a été également décrit suivant l'amertume du tubercule ; 70 % de manioc analysé est amer et 30 % doux.

## Evaluation

L'évaluation du matériel en collection à travers les collections testées et divers essais variétaux sur différents sites (stations secondaires, centres d'appui technique, fermes semencières) effectuée ces quinze dernières années, a permis de sélectionner du matériel performant adapté à plusieurs conditions écologiques, résistant ou tolérant aux principaux fléaux, et dont les rendements sont souvent supérieurs de 40 à 100 % voire 200 % aux variétés traditionnellement cultivées par les paysans. *Mabanza (Les variétés de manioc recommandées en République Populaire du Congo, 1989, voir fiche descriptive)* donne les principales caractéristiques du matériel actuellement vulgarisé ou en voie de l'être. Parmi les plus connues, on citera MM79, MM86 et MM 105 déjà vulgarisées dans les plateaux, tout comme 1M20, 42M8 et MM79 dans les régions de la Bouenza et du Pool. La grande plasticité des variétés MM78 et MM79 a été démontrée.

#### Evaluation agronomique

Le matériel retenu après 4 à 5 cycles d'essais variétaux multilocaux passe nécessairement par une évaluation agronomique avant d'être vulgarisé. Cette évaluation concerne :

Les caractéristiques du tubercule à la récolte : La récolte est ici effectuée à 12 mois pour les besoins de recherche. On relève alors : le nombre de racines commercialisables, la longueur et le diamètre moyens des racines, le poids moyen de la racine, le taux de féculé. En général, le nombre de racines dites commercialisables varie de 2 à 4, la longueur moyenne entre 30 et 60 cm, le diamètre entre 5 et 10 cm, le poids moyen entre 500 et 1 000 g et le taux de féculé entre 25 et 28 %.

Le rendement : Il est estimé en t/ha de tubercules frais. 11 varie de 4 à 7 t/ha en milieu traditionnel avec le matériel local. Des rendements moyens de 20 à 30 t/ha ont été observés avec des variétés élites telles MM78, MM79, MM86, MM 105, 1M20, 42M8.

foncé, celle des tiges adultes du pourpre cendré au brun cuivré en passant par le marron. Quant aux jeunes tiges, elles sont de couleur vert foncé ou vert tendre avec parfois des rayures colorées de rouge Bordeaux.

La racine tubérisée a été décrite selon sa forme, sa longueur et son diamètre. La forme va de conique à cylindrique. La longueur varie de 30 cm à plus d'un mètre et le diamètre à maturité de 5 à 10 cm. La racine a été également décrite selon la couleur de sa chair. Celle-ci peut être de couleur jaune ou blanche.

#### *Autres critères de description*

Le matériel a été également décrit suivant l'amertume du tubercule ; 70 % de manioc analysé est amer et 30 % doux.

## Evaluation

L'évaluation du matériel en collection à travers les collections testées et divers essais variétaux sur différents sites (stations secondaires, centres d'appui technique, fermes semencières) effectuée ces quinze dernières années, a permis de sélectionner du matériel performant adapté à plusieurs conditions écologiques, résistant ou tolérant aux principaux fléaux, et dont les rendements sont souvent supérieurs de 40 à 100 % voire 200 % aux variétés traditionnellement cultivées par les paysans. *Mabanza* (Les variétés de manioc recommandées en République Populaire du Congo, 1989, voir fiche descriptive) donne les principales caractéristiques du matériel actuellement vulgarisé ou en voie de l'être. Parmi les plus connues, on citera MM79, MM86 et MM 105 déjà vulgarisées dans les plateaux, tout comme 1M20, 42M8 et MM79 dans les régions de la Bouenza et du Pool. La grande plasticité des variétés MM78 et MM79 a été démontrée.

#### Evaluation agronomique

Le matériel retenu après 4 à 5 cycles d'essais variétaux multilocaux passe nécessairement par une évaluation agronomique avant d'être vulgarisé. Cette évaluation concerne :

Les caractéristiques du tubercule à la récolte : La récolte est ici effectuée à 12 mois pour les besoins de recherche. On relève alors : le nombre de racines commercialisables, la longueur et le diamètre moyens des racines, le poids moyen de la racine, le taux de féculé. En général, le nombre de racines dites commercialisables varie de 2 à 4, la longueur moyenne entre 30 et 60 cm, le diamètre entre 5 et 10 cm, le poids moyen entre 500 et 1 000 g et le taux de féculé entre 25 et 28 %.

Le rendement : Il est estimé en t/ha de tubercules frais. 11 varie de 4 à 7 t/ha en milieu traditionnel avec le matériel local. Des rendements moyens de 20 à 30 t/ha ont été observés avec des variétés élites telles MM78, MM79, MM86, MM 105, 1M20, 42M8.

Nom :

MM 86

**ORIGINE:** CongoZONE DE CULTURE  
(hachurée)**VOCATION:**

- Culture traditionnelle
- Culture mécanisée
- Cultures associées

**CARACTERISTIQUES DE LA PLANTE**

cycle: 12 - 24 mois

Port: **Érigé**densité de culture: 1m x 1m  
1,2m x 1,2m**CARACTERISTIQUES DU TUBERCULE**

- **Forme:** Cylindrique
- **Poids moyen:** 0, 5 Kg
- **goût:** Amer

**CARACTERISTIQUES AGRONOMIQUES**

- Résistance aux maladies:
  - **Mosaïque:** Sensible
  - **Bactériose:** Résistante
  - Pourriture:
- Résistance aux ravageurs:
  - Cochenilles: Tolérante
  - Acariens: Tolérante

**RENDEMENT**

19 T/ha en 1987 a  
**ODZIBA**, soit = à  
 MM 78 et 15.7%

inférieure à MM 79

## Points forts

- Résistante à la **bactériose**
- Convient très bien aux sols sableux

## Points faibles

Très **zonalisée**, ne convient surtout qu'à la zone des plateaux batéké

4 ans d'évaluation

**Les techniques culturales :** De nombreux travaux ont montré l'avantage d'un labour profond, d'un bouturage en début de saison pluvieuse, et de l'utilisation de boutures aoûtées saines (de 7 à 12 mois d'âge) à raison d'une bouture d'environ 20 cm de longueur par poquet et 10 000 pieds à l'hectare.

**La précocité :** Le paysan congolais récolte le manioc entre 18 et 24 mois après bouturage. On signale cependant, la présence dans le pays, de variétés récoltables à 6 mois (**Sanza Motoba**). Il s'agit là d'un matériel propre aux terres alluviales et dont les aptitudes (maturité à 6 mois) n'ont pu être confirmées ailleurs. Pour des besoins de recherches et dans le but de pouvoir comparer les résultats entre sites différents, voire entre pays différents, la

récolte des essais se fait à 12 mois. Des études en cours dans le pays montrent que les variétés actuellement disponibles peuvent être éclatées en plusieurs groupes de précocité. Il s'agit de la précocité de maturation ou de récolte qui ne saurait être confondue avec la précocité de tubérisation ou de floraison.

La réponse aux intrants : Des essais de fertilisation ont montré que le manioc répondait peu aux engrais, en particulier phosphoriques. Des études de physiologie sont ici nécessaires pour avoir plus d'explications sur ce comportement.

### Evaluation phytosanitaire

Le matériel a été également sélectionné suivant son comportement vis à vis de grands fléaux. La mosaïque, la bactériose (*Xanthomonas campestris* PV *manihotis*) et la cochenille (*Phenacoccus manihotis*) constituent les principaux maux auxquels le manioc est confronté au Congo. Une échelle de 1 à 5 (où 1 indique l'absence de dégâts et 5 la présence de dégâts pouvant entraîner la disparition de la plante) est utilisée pour évaluer l'importance des attaques des maladies et des insectes. La sélection par rapport à la bactériose se fait à partir des collections placées dans des zones à forte pression de maladie. La variété MM79 testée à Odziba, zone à forte pression de bactériose et de mosaïque s'est révélée tolérante par rapport à ces 2 fléaux.

Des études ont été réalisées avec succès sur la biologie et l'écologie de *Phenacoccus manihotis* et la lutte biologique a été retenue pour accentuer la pression régulatrice des auxiliaires locaux de ce ravageur. A ce titre, des entomophages exotiques originaires d'Amérique du Sud ont été introduits, acclimatés, puis lâchés. *Epidinocarsis lopezi* a montré des qualités appréciables dans la lutte biologique.

L'apparition de ces dernières années des pourridies sur les tubercules de manioc a ouvert une nouvelle voie de sélection. L'utilisation du matériel de plantation sain permet d'assainir progressivement les variétés. La culture *in vitro* (multiplication rapide) et la constitution des parcs à bois sont en ce moment utilisés pour produire du matériel sain.

### Evaluation par les producteurs

Dans le cadre de projets de transferts de technologie en milieu réel, des essais d'adoption de matériel végétal et de techniques culturales sont menés en milieu paysan par la recherche agronomique et les services compétents du Ministère de l'Agriculture et de l'Élevage. Ce travail a permis l'adoption de quelques variétés élites dont MM79, MM105, 42M8 et 1M20.

## Amélioration

Deux voies sont ici explorées : l'hybridation sexuée par l'équipe Bama à Loudima et la culture cellulaire par l'équipe Mabanza à Brazzaville.

## Hybridation sexuée

Elle est utilisée depuis une douzaine d'années et vise l'amélioration des rendements, la modification de l'architecture, et l'introduction des gènes de résistance aux maladies au niveau du matériel local. A ce propos, des clones de l'IITA issus de croisements entre *Manihot esculenta* et *Manihot glaziovii* ont été utilisés. Les variétés obtenues (1M20, 42M8) conviennent bien dans la vallée du Niari.

## Culture cellulaire

Elle a pour objectif d'apporter par des moyens appropriés des améliorations nécessaires aux variétés locales productives et largement cultivées par les producteurs. Des mises au point techniques ont été réalisées avec succès. Elles concernent la régénération de plantes à partir des tissus, l'isolement et la culture des protoplastes, la fusion cellulaire intra et interspécifique, le criblage des protoplastes dans des milieux sélectifs.

Le succès des travaux actuellement en cours au niveau de l'embryogenèse somatique à partir des protoplastes permettra d'ouvrir de nouvelles voies d'investigation sur l'amélioration génétique du manioc. Dans la recherche des gènes de résistance aux maladies, la collection *in vitro* s'est, grâce à la culture d'embryons, enrichie de *Manihot glaziovii* originaire de 2 sites. Cette recherche se poursuit au niveau des hybrides naturels entre *Manihot esculenta* et *Manihot glaziovii*.

## Atouts des ressources génétiques

Le Congo dispose en ce qui concerne le manioc de collections locales très diversifiées. A chaque zone écologique correspond une gamme de cultivars non encore totalement identifiés. Les travaux déjà réalisés ont permis de sélectionner ou de mettre au point du matériel végétal déjà vulgarisé, en voie de l'être, ou encore en essais à travers différents points du pays. Des espoirs plus importants sont permis avec les nombreux travaux d'amélioration en cours actuellement.

## Perspectives d'avenir

Les travaux futurs devront être dirigés vers :

- une poursuite de l'évaluation du patrimoine génétique,
- une implication de plus en plus forte au programme de sélection avec conduite des essais au champ et mise sur pied des systèmes de culture raisonnés, améliorés et reproductibles,
- une orientation de la sélection vers la résistance au complexe parasitaire (mosaïque, bactériose, cochenille, acararien vert, pourridjés),

- l'acquisition de connaissances plus approfondies sur la physiologie et la génétique de la plante,
- la poursuite de l'effort en matière de lutte biologique sur la cochenille d'une part et sur la mise au point des stratégies de lutte contre les maladies et les ravageurs d'autre part.

## Bibliographie

- DGRST**, 1990 — Programme National de Recherches sur le manioc : résultats et perspectives d'avenir. Brazzaville, septembre 1990.
- KANI M.** et **MINGUI J.M.** — La production du manioc en République Populaire du Congo. **DGRST** — Brazzaville, septembre 1989.
- MABANZA J.** — L'inventaire, la caractérisation et l'évaluation du matériel végétal au niveau du programme national congolais de recherche sur le manioc. Atelier réseau **CORAF Manioc Lome Togo 7** — 12 décembre 1987.
- MABANZA J.**, 1989 — Les variétés de manioc recommandées en République Populaire du Congo. **DGRST/ORSTOM** Brazzaville.
- MABANZA J.** — La variété **MM79**. **DGRST/ORSTOM**, 1990.
- MABANZA J.** — La variété **MM105**. **DGRST/ORSTOM** 1990.
- NGANGOUE B.** — Comportement et évolution de la productivité de 6 variétés élites de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) sur les plateaux Batékés (**Mbé-Odziba**). Station Agronomique Régionale **CRAL/ODZIBA** Mémoire **IDR**, Brazzaville, octobre 1991.
- VENNETIER P.** — Géographie du Congo Brazzaville. Gauthier Villars, Paris 1966.