

Utilisation des marqueurs moléculaires (RFLP et RAPD) pour l'estimation de la variabilité génétique au sein et entre des populations cultivées et spontanées des espèces du genre *Lathyrus*

Chtourou-Ghorbel N., Marrakchi M., Lauga B., Combes D.

in

Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.).
Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens

Zaragoza : CIHEAM
Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62

2004
pages 77-80

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=4600133>

To cite this article / Pour citer cet article

Chtourou-Ghorbel N., Marrakchi M., Lauga B., Combes D. **Utilisation des marqueurs moléculaires (RFLP et RAPD) pour l'estimation de la variabilité génétique au sein et entre des populations cultivées et spontanées des espèces du genre *Lathyrus***. In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). *Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens*. Zaragoza : CIHEAM, 2004. p. 77-80 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62)



<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

Utilisation des marqueurs moléculaires (RFLP et RAPD) pour l'estimation de la variabilité génétique au sein et entre des populations cultivées et spontanées des espèces du genre *Lathyrus*

N. Chtourou-Ghorbel****, B. Lauga**, D. Combes** et M. Marrakchi*

*Faculté des Sciences de Tunis, Laboratoire de Génétique Moléculaire, Immunologie et Biotechnologie, Campus Universitaire, 2092 Elmanar, Tunis, Tunisie

**Laboratoire d'Ecologie Moléculaire d'Université de Pau et des Pays de l'Adour, IBEAS, Avenue de l'Université, 64000 Pau, France

***Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie

SUMMARY – "Use of molecular markers (RFLP and RAPD) for assessment of genetic variability among and between cultivated and spontaneous populations of *Lathyrus* species". Genetic diversity assessment of five species belonging to the genus *Lathyrus* have been conducted with RFLP and RAPD markers. The analysis was performed on nine populations from the species *L. sativus*, *L. cicera*, *L. ochrus*, *L. latifolius* et *L. sylvestris*. Twenty two enzyme-probe combinations were identified 112 bands which 103 were polymorphic. Ten random primers generated 129 polymorphic PCR products whose size varied from 0.3 to 3 Kb. The results from RFLP analysis confirm widely previous data based on RAPD markers. The level of the variability detected by RAPD markers is more higher, due probably to the biggest ability of those markers to reveal polymorphism.

Key words: *Lathyrus*, *Leguminosae*, genetic diversity, RFLP, RAPD.

Introduction

Le genre *Lathyrus* (Légumineuse, Fabaceae) occupe une aire importante dans les régions tempérées de l'hémisphère nord ainsi que dans les montagnes d'Afrique tropicale (Erskine *et al.*, 1994). Cette large aire de distribution est due à la tolérance des plantes de ce genre aux conditions environnementales défavorables telles que la sécheresse et l'excès d'eau (Tyagi *et al.*, 1995). Les *Lathyrus* présentent aussi une tolérance aux facteurs abiotiques (les pH extrêmes, les sols pauvres) et aux facteurs biotiques comme la rouille et les virus (Duke, 1981).

En Tunisie, ce genre est représenté par une quinzaine d'espèces à large aire de répartition. Ces espèces cultivées essentiellement pour la production des graines (alimentation de l'homme et du bétail) sont aussi utilisées comme fourrage en ensilage ou en engrais vert. Malgré les intérêts aussi bien agronomiques qu'économiques importants que présentent les *Lathyrus*, leur culture en Tunisie, demeure très limitée par rapport à celles des autres légumineuses à graines ou fourragères.

Dans le but d'une exploitation plus rationnelle de ces plantes rustiques et bien adaptées aux conditions du milieu, un programme de recherche, visant une meilleure connaissance de leur biologie florale et de leur diversité génétique, a été entrepris.

Des études d'évaluation génétique ont d'ores et déjà défini les modes de reproduction de trois taxons de *Lathyrus* et estimé la variabilité génétique par des analyses des paramètres morphologiques, du polymorphisme enzymatique et de la pigmentation florale. En relation avec ces travaux, nous nous sommes intéressés à l'étude de la diversité génétique des populations d'origines géographiques diverses appartenant aux espèces *L. sativus*, *L. cicera*, *L. ochrus*, *L. latifolius* et *L. sylvestris* par l'analyse du polymorphisme moléculaire basée sur les marqueurs RFLP et RAPD.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Notre travail a porté sur neuf populations (Tableau 1) appartenant à cinq espèces différentes

représentant deux sections du genre *Lathyrus*. Seule l'espèce *L. ochrus* fait partie de la section Clymenum. *L. sativus*, *L. cicera*, *L. latifolius* et *L. sylvestris* appartiennent à la section Lathyrus (Kupicha, 1983).

Tableau 1. Origines des populations étudiées

Section	Espèce	Origine	Désignation	Nb. de plantes
Lathyrus	<i>L. sativus</i>	Sfax (Tunisie)	S	18
		Addis Abeba (Ethiopie)	E	18
	<i>L. cicera</i>	Zarzis (Tunisie)	Z	18
		Elvas (Portugal)	P	18
	<i>L. sylvestris</i>	Chapelle de rousse (France)	C	10
		Hongrie	H	17
	<i>L. latifolius</i>	Bar-sur-Loup (France)	B	10
Clymenum	<i>L. ochrus</i>	Kompolt (Hongrie)	L	5
		Ariana (Tunisie)	O	18

RFLP : L'ADN génomique a été digéré par trois enzymes de restriction (Bam H1, EcoRI et HindIII), puis transféré sur une membrane de nylon. L'ensemble des populations a été analysé avec 8 sondes différentes : Sept (A1, C30, C35, C36, C37, C38 et C39) provenant d'une banque génomique partielle de *Lathyrus* et une sonde Ri correspondant à une région interne de l'ADN ribosomal 25S de maïs. Le marquage radioactif des sondes par l'isotope (α^{32} P dCTP) est adopté.

RAPD : Vingt amorces du Kit J ont été testées. Les amplifications sont réalisés dans un thermocycleur de type Braun selon le programme suivant : 1 cycle de 5 min à 94°C, 1 min à 36°C et 2 min à 72°C ; 40 cycles de 50 s à 94°C, 1 min à 36°C et 2 min à 72°C ; 1 cycle de 50 s à 94°C, 1 min à 36°C et 10 min à 72°C. Chaque réaction d'amplification contient 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mg/ml gelatin, Triton x100 0.1%, 0.1 mM de chaque dATP, dCTP, dGTP et dTTP (Appligene), 15 ng d'amorce, 50 ng d'ADN et 1 unité de Taq polymérase (Appligene).

Analyses statistiques : Les données RAPD et RFLP sont soumis à une analyse en composantes principales. Des arbres parcimonieux reposant sur le calcul du maximum de vraisemblance ont été construits indépendamment par le programme dollop du logiciel Phylip (Felsenstein, 1993) à partir des matrices de données RFLP et RAPD.

Résultats

Marqueurs RFLP

Vingt deux couples enzyme-sonde ont permis d'identifier au total 112 bandes dont 103 soit 91,96% sont polymorphes. Ceci donne une valeur moyenne de 12 875 bandes polymorphes par sonde. Chaque couple enzyme-sonde est caractérisé par un certain nombre de bandes variant de 2 à 12, avec une moyenne de 5,09 bandes. Toutes les sondes testées présentent des profils d'empreintes génétiques distincts et de degrés de polymorphisme différents.

L'analyse en composantes principales réalisée sur les fréquences d'apparition des bandes RFLP chez les différentes populations montre l'isolement net de la population Ariana de l'espèce *L. ochrus* des autres populations. Sur l'axe 2 de la représentation graphique de la dispersion des populations dans le plan 1-2, il y a une distinction nette entre les espèces de la section Lathyrus (Fig. 1).

L'arbre parcimonieux, reliant les différentes populations analysées, montre que la population Ariana de l'espèce *L. ochrus* se sépare des autres populations pour s'isoler et former un groupe à part (Fig. 2). Les populations des espèces *L. sativus*, *L. cicera*, *L. latifolius* et *L. sylvestris* font partie d'un même groupe qui peut être également divisé en deux sous groupes. Le premier sous groupe est formé des populations de *L. sativus* et *L. cicera* alors que le deuxième comprend les populations de *L. latifolius* et *L. sylvestris*.

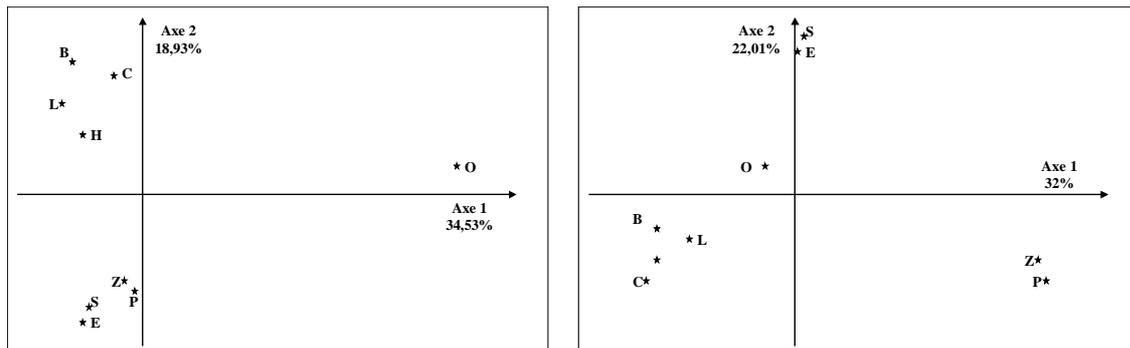


Fig. 1. Représentations graphiques de l'ensemble des populations étudiées de *Lathyrus* dans le plan 1-2 d'une analyse en composantes principales réalisé à partir des fréquences de bandes RFLP (A) et des fréquences des bandes RAPD (B).

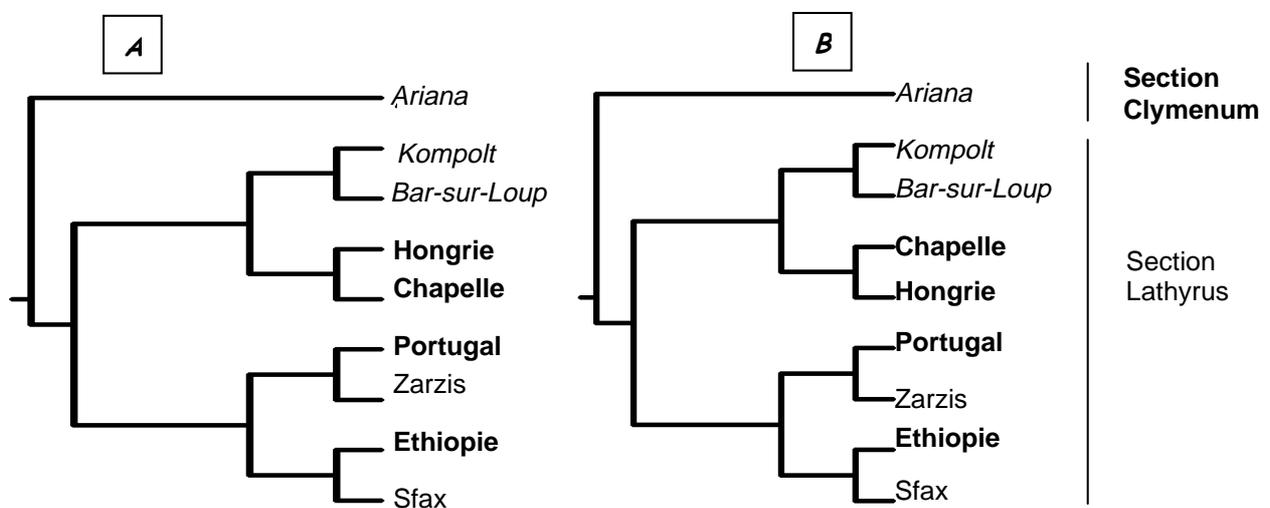


Fig. 2. Arbres phylogénétiques reliant les populations étudiées de *Lathyrus* sur la base de la parcimonie construit par le programme Dollop du logiciel Phylip à partir des données RFLP (A) et des données RAPD (B).

Marqueurs RAPD

Parmi 20 amorces testées, uniquement dix ont été sélectionnées pour la qualité des profils et la productibilité des produits amplifiés. Ces amorces ont généré 129 fragments RAPD polymorphes dont la taille est comprise entre 0,3 et 3 Kb. Sur l'ensemble des populations, chaque amorce présente 8 à 17 bandes. Le degré de polymorphisme observé aussi bien à l'intérieur de chaque population qu'entre les différentes populations, est fonction de l'amorce utilisée. En tenant compte de l'ensemble des bandes générées avec les 10 amorces, on déduit que la population éthiopienne de l'espèce *L. sativus* est la plus polymorphe. En effet, cette population montre 30 bandes polymorphes sur 58 bandes amplifiées, soit 51,72%. A l'inverse, la population portugaise de *L. cicera* s'avère la moins polymorphe (6,89% de variabilité).

La représentation graphique de la dispersion des populations dans le plan 1-2 d'une ACP montre le regroupement des populations de chaque espèce et ce malgré leur éloignement géographique (Fig. 1). Elle permet aussi de montrer une bonne dispersion des espèces à l'exception de *L. sylvestris* et *L. latifolius* qui paraissent relativement proche.

L'arbre phylogénétique reliant les populations étudiées sur la base de la parcimonie à partir des données RAPD révèle des résultats tout à fait identiques à ceux obtenus par l'arbre parcimonieux

réalisé sur la base des marqueurs RFLP. Les résultats de cet arbre confirment clairement le rapprochement génétique d'une part entre les populations de *L. sylvestris* et celles de *L. latifolius* et d'autre part les populations de *L. sativus* et de *L. cicera* (Fig. 2).

Discussion

En complément des travaux déjà réalisés sur le genre *Lathyrus* (Ben Brahim, 1990 ; Chtourou-Ghorbel *et al.*, 2000) utilisant les marqueurs morphologiques, isoenzymatiques et de pigmentation florale, nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce travail à l'étude du polymorphisme moléculaire en nous basant sur deux types de marqueurs : RFLP et RAPD. Cette étude a porté sur 9 populations d'origines géographiques diverses et présentant cinq espèces du genre *Lathyrus*.

L'analyse en composantes principales réalisée aussi bien sur les données RFLP que sur les données RAPD, montre qu'il est parfaitement possible de différencier la majorité des espèces étudiées. Les deux espèces *L. sylvestris* et *L. latifolius* paraissent relativement proches. Ce résultat est en faveur d'un flux génique entre ces deux espèces pérennes ; il confirme l'existence de ressemblance morphologique entre elles. La possibilité d'hybridations interspécifiques rapportée par Davies (1958), appuie fortement les échanges de gènes entre ces deux espèces.

Les résultats mis en évidence par l'arbre phylogénétique établi sur la base de la parcimonie à partir des données RFLP concordent largement avec ceux donnés par l'arbre construit à partir des données RAPD. Ces arbres montrent une grande similitude génétique entre les populations *L. sylvestris* et *L. latifolius*. Cette similitude apparaît aussi pour les populations de *L. sativus* et *L. cicera*. Ce résultat confirme ainsi les conclusions de Jackson et Yunus (1984) qui ont montré une relative affinité morphologique entre ces deux taxons. Croft *et al.* (1999) ont montré également cette similitude en utilisant les marqueurs RAPD.

Les résultats de l'analyse du polymorphisme moléculaire basée sur les marqueurs RFLP ont confirmé largement ceux obtenus par les marqueurs RAPD. Le niveau de la variabilité détecté par les marqueurs RAPD est plus élevé, dû probablement à une plus grande capacité de ces marqueurs à révéler du polymorphisme.

Références

- Ben Brahim N. 1990. Biologie florale et variabilité morphologique et enzymatique chez trois espèces de *Lathyrus* : *L. cicera* L., *L. articulatus* L. et *L. ochrus* D.C. Thèse de 3^{ème} cycle, Faculté des Sciences de Tunis, 99 p.
- Chtourou-Ghorbel N., Ben Brahim N., Boussaïd M., Marrakchi M. 2000. Flower pigmentation analysis in populations of *Lathyrus sativus* L. and *Lathyrus cicera* L. Annales de l'I.N.R.A.T., 73 : 3-15.
- Croft A.M., Pang E.C.K., Taylor P.W.J. 1999. Molecular analysis of *Lathyrus sativus* L. (grasspea) and related *Lathyrus* species. Euphytica, 107 : 167-176.
- Davies A.J.S. 1958. A cytogenetic study in the genus *Lathyrus*. Ph.D. Thesis Manchester Univ., 239 pp.
- Duke J.A. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York, p. 199-265
- Erskine W., Smartt J., Muehlbauer F.J. 1994. Mimicry of lentil and the domestication of common vetch and grass pea. Economic Botany, 48 (3) : 326-332.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5. Distributed by the author. Seattle, University of Washington.
- Jackson M.T., Yunus A.G. 1984. Variation in the grasspea (*Lathyrus sativus* L.) and wild species. Euphytica, 33 :549-559.
- Kupicha F.K. 1983. The infrageneric structure of *Lathyrus*. Notes Roy. Bot. Gard. Edinb., 41(2) :209-244.
- Tyagi A., Santha I.M., Mehta S.L. 1995. Molecular response to water stress in *Lathyrus sativus*. J. Plant Bioche. Biotech., 4 : 47-49.