

Research

open access

Caractérisation moléculaire d'une collection autochtone de *sulla* du nord *Hedysarum coronarium* L. et estimation de la variabilité génétique par les marqueurs AFLP

F. BEN JEDDI¹
M. JAMMAZI¹

¹ University of Carthage, Institut National Agronomique de Tunisie, Research Unit Vegetable and Flower, 43 Avenue Charles Nicolle 1082 Mahrajène city Tunis, Tunisia

Summary - 23 wild genotypes collected from different climatic regions of Tunisia and 6 Italian cultivars of *Hedysarum coronarium* L. (*sulla*), were identified and characterised by using the AFLP molecular marker. Electrophoresis profiles obtained indicated a very high percentage of polymorphism for all accessions exceeding 80 %. The statistical analysis of the data obtained show that genotypes could be partitioned on to three to four distinct groups. The local collection of *sulla* showed more than 50 % similarity index suggesting a greater useable genetic variability.

Keys words : AFLP / molecular marker / genotypes / *sulla*

Résumé - Dans ce travail 23 génotypes locaux d'*Hedysarum coronarium* L. (*sulla* du nord) collectées de diverses régions pédoclimatiques ont été caractérisés par le biais des marqueurs moléculaires AFLP en comparaison avec 6 cultivars d'origine italienne. L'analyse des profils électrophorétiques obtenus a montré un pourcentage de polymorphisme très élevé dépassant 80 %. Ainsi, les génotypes locaux peuvent être répartis en 3 à 4 groupes distincts. La collection locale de *sulla* se caractérise par un indice de similarité supérieur à 50 %. Ceci montre l'importance de la variabilité génétique des génotypes de *sulla* dans les programmes d'amélioration.

Mots clés : AFLP / marqueurs moléculaires / génotypes / *sulla*

1. Introduction

Le patrimoine génétique pastoufourager autochtone constitue une richesse d'une grande importance (Heyn, 1963; Abdelguerfi et al., 1996; Ben Jeddi et al., 1998 et Ben Jeddi, 2005). L'évaluation et la préservation de la diversité génétique des espèces sauvages sont fortement utiles pour la création variétale et l'amélioration des espèces entre autres *Hedysarum coronarium* L., comme plante fourragère et pastorale de grande valeur agronomique (Ben Jeddi, 2005). Des études sur la variabilité morphologique, bio-agronomique, iso-enzymatique, génétique et moléculaire ont intéressé l'espèce sulla (Baatout et al., 1985; Trifi et Marrakchi, 1999, Louati et al., 2000; Khriji et al., 2002 et Ben Jeddi, 2005). Ces travaux démontrent l'existence d'une importante variabilité génétique indépendamment de l'origine géographique.

Encore à l'état spontané, la diversité naturelle du sulla est soumise à l'érosion génétique amplifiée par l'action de l'homme (urbanisation..), les conditions éco-géographiques stressantes (surpâturage, sécheresse..) et l'introduction de variétés étrangères (Ben Jeddi, 2005). Ces facteurs érosifs engendrent une dégradation des ressources phyto-génétiques entraînant parfois la raréfaction

voir la disparition de certaines espèces reliques cantonnées actuellement dans des zones limitées.

Cependant, les variétés commerciales présentes sur le marché local comme Grimaldi, Sgaravatti, Sparacia (Italie), Aigainon (Grèce), Aoukou et Necton (Nouvelle Zélande) ont souvent montré leur faible valeur adaptative aux conditions pluviométriques très aléatoires de la Tunisie (Ben Jeddi, 2005).

Le progrès de la biologie moléculaire pour l'analyse du génome a révélé que la variabilité génétique au niveau de l'ADN est plus importante par rapport aux produits géniques et que les marqueurs moléculaires de l'ADN produits sont très efficaces pour la caractérisation des variétés, lignées et clones dans différentes espèces (Cooke, 1995; Rao et al., 1997; Zhu et al., 1998; Ambrosino et al., 2002).

Le présent travail consiste alors à une caractérisation moléculaire par marqueurs AFLP pour révéler le polymorphisme intra-spécifique dans une collection d'*Hedysarum coronarium* L locale, classer les différents génotypes selon leurs distances génétiques, et essayer d'isoler des groupes différents intéressants pour des améliorations variétales ultérieures.

2. Matériels and Méthodes

2.1. Origine des génotypes

Le matériel génétique consiste à une collection de 29 génotypes d'*Hedysarum coronarium* L. dont 23

écotypes tunisiens (Ben Jeddi et al., 1998) et 6 cultivars d'origine italienne. Le tableau 1 présente la distribution géographique du matériel biologique utilisé.

Tableau 1. Liste des géotypes de *Hedysarum coronarium* L. utilisés selon leur origine

	géotypes	mainteneur	Lieu de collecte
Collection tunisienne	S1L9	INAT	Sidi médiane
	S1L10	INAT	Sidi médiane
	S1XS1XS1	INAT	Hybride
	S2L7	INAT	Oued Zarga
	S2XS1	INAT	Hybride
	S3L2	INAT	Béja
	S4L1	INAT	Ksar Mézouar
	S5L6	INAT	Tinja
	S6L1	INAT	Khetmine
	S6L7	INAT	Khetmine
	S7L4	INAT	El Fahs
	S7L5	INAT	Zaghouan
	S7L9	INAT	Fahs
	S8L1	INAT	Saouaf
	S8XS10	INAT	Hybride
	S10L3	INAT	Jebel Sidi Abderrahmane
	S12L4	INAT	Bir Dressen
	S12L5	INAT	Bir Dressen
	S14L6	INAT	EL Kef
	S19L1	INAT	Makthar
S20L1	INAT	Thala	
S21L1	INAT	Tunis	
Collection italienne	343	FAP	Italie
	3047	FAP	Italie
	3070	FAP	Italie
	3074	FAP	Italie
	3080	FAP	Italie
	3086	FAP	Italie

INAT: Institut National Agronomique de Tunisie

FAP: Faculté d'Agronomie de Portici Italie

2.2. Extraction de l'ADN

Les semences de chaque géotype ont été semées séparément dans des bacs de dimension 40x20 cm et mises en germination dans un germoir à température et luminosité contrôlées respectivement 25°C et 16 heures de photopériode durant 30 jours. Un intervalle d'arrosage de 48 heures a été respecté durant toute la période de germination. Au stade 3 feuilles unifoliolées, 5gr de feuilles ont été récoltées et surgelées à -80°C dans l'azote liquide. L'extraction de l'ADN a été faite selon la méthode modifiée de Probesky, 1997. Pour obtenir 10 µg d'ADN, il faudra 1 gr de feuilles. L'ADN est quantifié sur

la base d'une confrontation avec une concentration connue d'ADN purifié du phage λ. L'ADN isolé est par la suite conservé à -20°C.

2.3. Digestion de l'ADN et préparation de la réaction

Pour la digestion de l'ADN, on a utilisé la combinaison d'enzymes de restriction ECORI/MseI. 500 ng d'ADN génomique ont été digérés pendant une heure à 37°C en utilisant 5 u de MseI (Gibco) et 5 u de ECORI (Takara). Le tampon de digestion de 40 µl consiste à 10 mM tris Hac. à pH 7,5; 10 mM Mg ac.; 50 mM K ac.; 5 mM DTT et 50 ng/µl BSA.



Pour la liaison 10 μ l d'une solution contenant 5 mmol de ECORI *biotine adapter*, 50 mmol de MseI *adapter*; 1u T4 DNA ligase; 1mM ATP dans 1 mM Tris-Hac. à pH 7,5; 10mM MgAc.; 50 mM Kac.; 5 mM DTT et 50 ng/ μ l BSA ont été ajoutées (Lin et Kuo, 1995). L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 3 heures. Le produit de la réaction a été conservé à -20°C.

2.4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

La réaction AFLP emploie généralement deux amorces d'oligonucléotides correspondant aux deux extrémités générées de deux enzymes ECORI et MseI (Vos et *al.*, 1995). L'une des deux amorces est généralement liée à l'extrémité ECORI est marquée par le phosphore (γ^{33}) ATP et T₄ poly-nucléotide kinase. La réaction de marquage pour 100 PCR consiste à un mélange de 2 mM Tris HCl à pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0,5 mM spermidine (3 HCl *forming*); 500 ng d'amorce; 100 μ ci (γ^{33}) et 10 u T4 poly-nucléotide- kinase. Pour l'amplification on

a utilisé 30 ng d'amorce MseI; 5 μ l d'ADN; 0,4 u taq- polymérase (Perkin Elmer); 10 mM Tris-HCl à pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl et 0,2 mM de 4 dNTP.

Les conditions du PCR dépendent de la nature de sélectivité de l'extension de l'amorce utilisée pour l'amplification (Zabeau et Vos, 1993). Les conditions pour une sélectivité d'un seul nucléotide consistent à 20 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, une minute d'*annealing* à 56°C et une minute d'extension à 72°C. Cette réaction est dite pré-amplification. Alors que l'amplification sélective correspond à une sélectivité de trois nucléotides comportant 36 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'*annealing* à 65°C avec un gradient de 0,7°C pour les 12 premiers cycles et puis à 56°C pour les 23 cycles restants et enfin une minute d'extension à 72°C. Toutes les réactions d'amplification ont été faites dans un PE-9600 *thermocycler* (Perkin Elmer corp. Norwalk CT. USA). Le tableau 2 présente la liste des oligonucléotides et des amorces utilisées pour les réactions d'amplification.

Tableau 2. Séquences d'oligo-nucléotides utilisées pour la réaction AFLP

Oligo-nucléotides	Séquences
<u>Adapter</u> ECORI	<i>Forward adapter</i> 5-biotine-CTCGTAGACTGCGTACC <i>Reverse adapter</i> CTGACGCATGGTTAA-5
MseI	<i>Forward adapter</i> 5-GACGATGAGTCCTGAG <i>Reverse adapter</i> TACTCAGGACTCAT-5
<u>Pré-sélective primer</u> ECORI-A MseI-C	5-GACTGCGTACCAATTCA 5-GATGAGTCCTGAGTAAC
<u>Selective primers</u> ECORI-ACG ECORI-AAC ECOR-ATG MseI-CAC MseI-CAA MseI-CAG	5-GACTGCGTACCAATTCAACG 5-GACTGCGTACCAATTCAAAC 5-GACTGCGTACCAATTCAATG 5-GATGAGTCCTGAGTAACCAC 5-GATGAGTCCTGAGTAACCAA 5-GATGAGTCCTGAGTAACCAG

2.5. Préparation des échantillons et électrophorèse

Au produit de l'amplification dilué 10 fois dans une solution de TE, on a ajouté un volume égal (20µl) de formamide dye (98% formamide, 10mM EDTA à pH 8 et quelques mg du bleu de bromo-phénol et de xylène cyanol).

Après 5 minutes, le mélange a été dénaturé à 94°C, puis rapidement refroidi dans la glace. 8µl de chaque échantillon seront analysés dans un gel dénaturant de poly-acrilamide à 5% / bis-acrylamide 19:1; 7,5 M urée; 50 mM Tris; 50 mM acide borique et 1 mM EDTA. Pour 100 ml de solution d'acrylamide on a ajouté 500 µl de APS à 10% et 50 µl de TEMED.

L'électrophorèse a été effectuée sur un gel de séquençage 38 x 50 (*Biorad Laboratories, Inc.* Hercules CAUSA). Le tampon utilisé consiste à une solution de 100 mM Tris; 100 mM acide borique et 2

mM EDTA. L'électrophorèse a été faite à un voltage constant de 1600 volts pour une période de 3 heures. Ensuite, le gel a été récupéré et séché sur un gel *dryer* (*Biorad Laboratories Inc.* Hercules CAUSA) à 80°C pour deux heures. Le gel a été exposé à une pellicule radio sensible (Kodak) pour 70 heures.

2.6. Analyse des données

Le polymorphisme a été détecté par la présence ou l'absence de bandes suite à une lecture des profils électrophorétiques obtenus.

Les données ont été analysées statistiquement par le programme informatique NTSYS-PC version 2 pour Windows (Rohlf, 1992). Le degré d'information du marqueur a été déterminé par le PIC (*Poly-morphic Information Content*) est calculé pour le

marqueur AFLP selon la formule de Powell et *al.*, (1996).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1} f_i^2$$

La fréquence de l'allèle *i* (*f_i*) dans le total des génotypes estime le taux de discrimination pour un locus moléculaire en tenant compte non seulement du nombre d'allèles par locus mais aussi de leurs fréquences relatives dans la population étudiée (Lübberstedt et *al.*, 2000).

L'indice du marqueur MI ou *Marker index* est déterminé pour balancer le taux de polymorphisme détecté (PIC). Il a été calculé selon la formule:

$MI = PIC \times \beta \times \alpha$ (Powell et *al.*, 1996).
 β est la proportion des bandes polymorphes et α est le nombre d'allèles par essai.

Les données obtenues par AFLP ont été enregistrées sous forme binaire (Absence: 0, présence: 1) sur une matrice rectangulaire. La similarité génétique (GS) entre deux génotypes *i* et *j* a été déterminée selon la formule de Nei et Li (1979):

$GS_{ij} = 2 N_{ij} / (N_i + N_j)$
N_{ij}: le nombre de bandes en commun entre les génotypes *i* et *j*; et
N_i et *N_j*: le nombre total des bandes pour les génotypes *i* et *j*.

GS_{ij} nous renseigne sur la proportion des bandes en commun entre deux génotypes et il varie de 0 (aucune bande commune) à 1 (profil identique pour deux lignes).

La matrice de similarité obtenue par la méthode AFLP a été convertie en une mesure de distance (*d*) par la formule $d = 1 - GS$ est servira à générer une classification hiérarchique (*Cluster*) par la méthode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with arithmetic Average*) (Sneath et *al.*, 1973).

3. Résultats et Discussion

Le marqueur moléculaire utilisé dans ce travail AFLP est capable de déceler les différences existantes entre les génotypes étudiés. Un taux élevé de polymorphisme a caractérisé tous les profils électrophorétiques de la collection d'*Hedysarum coronarium* L. l'analyse des 5 combinaisons d'amorces utilisées (Tableau 3) a montré un total de 476 bandes dont 436 bandes polymorphes et 40 bandes monomorphes manifestant ainsi un pourcentage de bandes polymorphes égal à 91,59 %.

Tableau 3. Analyse des bandes d'amplification obtenues par AFLP

Marqueur	Génotypes	Nombre d'essai	N°total bandes	N°des bandes / essai	% des bandes polymorphes	N° bandes polymorphes par essai	N°locus par essai	PIC	MI
AFLP	29	5	476	95,2	91,59	86,63	95,2	0,32	27,72

Cependant, le degré d'information du marqueur PIC est élevé grâce au taux de polymorphisme important trouvé pour tous

les génotypes. Ce résultat est conforme à des travaux sur d'autres espèces comme le blé (Bohn et *al.*, 1999; Donini et *al.*, 2000);

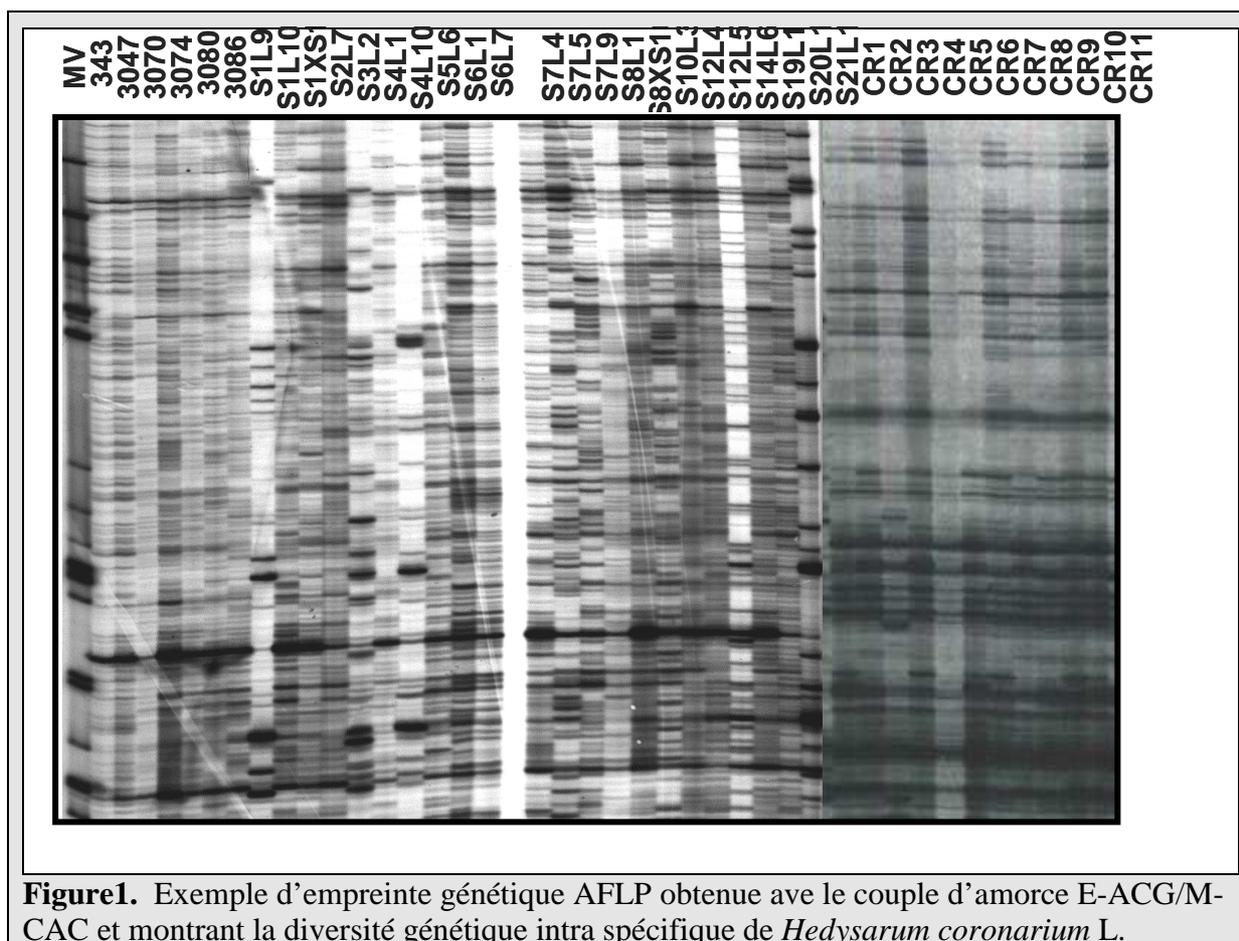


l'orge (Russel et *al.*, 1997); le maïs (Lübberstadt et *al.*, 2000); et le soja (Powell et *al.*, 1996).

La variabilité génétique intra-spécifique a été déterminée selon la lecture auto-radiographique des différents génotypes d'*Hedysarum coronarium* L. Cette lecture a révélé un numéro de

bandes AFLP variable d'un minimum de 65 à un maximum de 112.

La figure 1 illustre un exemple de polymorphisme généré par la combinaison E-ACG/M-CAC et met en évidence la diversité génétique existante au sein et entre les collections tunisienne et italienne.



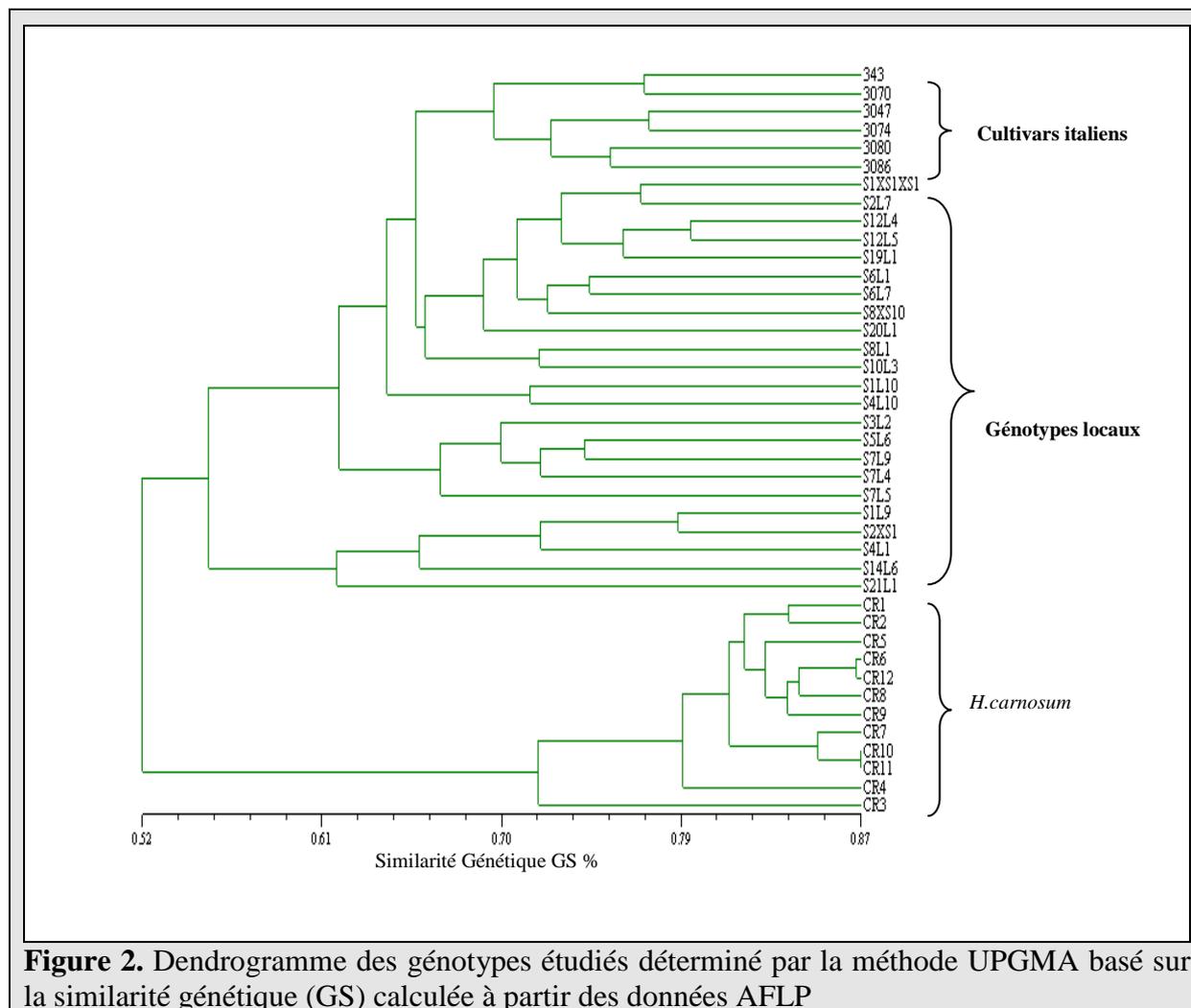
Les copies d'amorces utilisées donnent des informations différentes sur le pourcentage des bandes polymorphes qui varie de 86,37 % pour le couple E-AAC/M-CAA à 93,33 % pour le couple E-ACA/M-CAG. Le pourcentage élevé des bandes polymorphes montre que les génotypes utilisés sont très distincts du point de vue génétique.

L'analyse du degré d'information du marqueur PIC pour les différents

génotypes de la collection de *Hedysarum coronarium* L. a donné une valeur de 0,32. Ceci montre que la technique AFLP peut être utilisée avec fiabilité au sein de l'espèce. L'indice du marqueur MI est élevé de l'ordre de 27,7. Ceci montre l'efficacité de cette technique à explorer la totalité du génome par un nombre réduit d'amorces.

La matrice de similarité obtenue a montré que la similarité génétique varie significativement. En effet, pour la collection d'*Hedysarum coronarium* L., l'indice de similarité est compris entre 0,54 et 0,78. Afin de déterminer les relations

existantes entre les génotypes, une classification hiérarchique (*cluster*) a été établie en se basant sur la matrice de similarité calculée à partir de la matrice binaire (figure 2).



Le dendrogramme obtenu met en évidence la différence entre les deux collections qui forment deux groupes différents. Toutefois, il faut signaler qu'il existe au moins 50 % de similarité génétique entre eux. La collection italienne se distingue facilement de la tunisienne; avec une distance génétique de l'ordre de 0,35. on note ainsi l'importance de l'origine géographique dans la diversité génétique.

but d'une amélioration génétique est encore possible à travers des collectes ciblées (Ben Jeddi, 2005). Plusieurs génotypes semblent être intéressants comme futurs géniteurs à utiliser dans un programme d'amélioration génétique comme S1L9, S2XS1, S4L1, S14L6 et S21L1.

Dans ces conditions, la sauvegarde du patrimoine génétique fourrager dans le



4. Conclusion

Actuellement la diversité biologique fourragère autochtone se trouve menacée par une érosion génétique amplifiée par des stress abiotiques chroniques comme la sécheresse. La prospection et collecte de germoplasme à partir de diverses régions bioclimatiques permettent de mieux contrôler l'évolution des ressources phytogénétiques. Ce matériel biologique destiné à l'amélioration doit être bien caractérisé afin de mieux reconnaître son génome et de mieux orienter les programmes d'amélioration génétique.

Il a été montré que la technique AFLP est une méthode fiable pour l'étude de la diversité génétique au sein de l'espèce *Hedysarum coronarium* L. Cette méthode couplée à une bonne caractérisation morphologique peut constituer un puissant outil dans les programmes d'amélioration variétale (Ben Jeddi, 2005). La caractérisation moléculaire des génotypes de sulla local comparé à des témoins d'origine italienne a montré que le germoplasme autochtone se distingue facilement de l'italien avec une distance génétique de 0,35. Toute fois, avec un indice de similarité inter-génotypique supérieur à 50 % et un taux de polymorphisme élevé la création variétale devient une voie de promotion pour cette diversité génotypique dans l'espèce *Hedysarum coronarium* L.

5. Bibliographie

- Abdelgarfi A. et Laouar M. (1998)** Autoécologie des légumineuses spontanées d'intérêt fourrager et/ou pastoral en algérie. Revue de l'institut national agronomique El Harrach, 1998: 97-101.
- Ambrosino O. (2002)** Marcatori AFLP per l'identificazione di cultivar di olivo e per la stima della variabilità genetica intra-ed inter-varietale. Italus Hortus. 9: 36-40.
- Baatout H. Marrakchi M. Mathieu C. et Vedel F. (1985)** Variation of plastid and mitochondrial DNAs in the genus *Hedysarum*. Theor. Appl. Genet. 70: 577-584.
- Ballator G.P. (1972)** La produzione forragera negli ambiente semi aridi con particolare riferimento alla Sicilia. L'info. Agrario. 27: 7433-7464.
- Ben Jeddi F. Zouaghi M. et Behaeghe T. (1998)** Problématique le sulla sauvage: biodiversité et création variétale. In Actes du 1^{er} séminaire international sur la mobilisation, exploitation et conservation des ressources naturelles. M'hiri A. ed. Tunis 10-12 Novembre 1997: 387-397.
- Ben Jeddi F. (2005)** *Hedysarum coronarium* L.: variation génétique, création variétale et utilisation dans des rotations tunisiennes. Doctorat en Sciences Biologiques Appliquées. Université de Gent, Faculté des Sciences en Bio-Ingénierie, Gent-Belgique: 216p.
- Bohn M. Utz H.F. et Melchinger A. E. (1999)** Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs and SSRs and their use for predicting progeny variance. Crop Sci.39: 228-237.
- Cooke R.J. (1995)** New diagnostics in crop sciences. Skeritt & aples. CAB international: 33-63.
- Donini P. Law J.R. Koebner R.M.D. Reeves J.C. et Cooke R.J. (2000)** Temporal trends in the diversity of UK wheat. Theor. Appl. Genet. 100: 912-917.
- Heyn C.C. (1963)** The annual species of *Medicago*. Scripta hierosoly mitana 12. 15p.
- Lübberstadt T. Melchinger A.E. Duble C. Vuylsteke M. et Kuiper M.**



- (2000) Relationships among early European maize inbreds: IV. Genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD and pedigree data. *Crop Sci* 40: 783-791.
- Nabli A. (1989)** Essai de synthèse sur la végétation et la phytoécologie tunisienne. *Éléments de botanique et de phytoécologie*. Tunis. Imp. Off. Rep. tunisienne, 247p.
- Nei M. et Li W. H. (1997)** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. ., USA*. 76: 7155-7160.
- Pottier Alapetite G. (1979)** Flore de la Tunisie:Angiospermes, dicotylédones, gamopétales. ed. I.O.R. Tunisie, vol2: 538p.
- Powell W. Morgante M. Andre C. Hannafey M., Vogel J. Tingey S.et Rafalski A. (1996)** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol. Breed*. 2: 225-238.
- Probesky S. Bailey L.G. et Baum B. R. (1997)** Modification of a CTAB DNA extraction protocol from plant containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular biology reporter*. 15: 8-5.
- Rao R. et Monti L. M. (1997)** Innovative tools for the characterisation of plant genetic resources. *Neglected plant genetic resources with a landscape and cultural importance for the mediterranean region*, 39-41.
- Rholf F.J. (1992)** NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 1.7. Owner manual.
- Russel J. fuller J.D. Macaulay M. Hatz B.G. Jahoor A. Powell W.et Ganai M.W. (1998)** A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
- Sneath P. H. et Sokal R. R. (1973)** Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Eds. Kennedy D., Park R.B Freeman. San Francisco.
- Trifi farah N. et Marrakchi M. (1999)** Etude des formes spontanées et cultivées de *Hedysarum coronarium* L. Analyse morphologique, enzymatique et moléculaire. *Forum de la rencontre internationale: Gestion des ressources génétiques des plantes en Afrique et savanes*. Bamako, Mali, 26-28 février 1997.
- Vos P. Hogers R. Bleeker M. Reijan M. Van de lee T. Hornes M. Frijters A. Pot J. Peleman J. Kuiper M. et Zabeau M. (1995)** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acid research*. 1995, vol 23, n 21: 4407-4414
- Zabeau M. et Vos P. (1993)** European patent application. Publication n°: EP0534858.
- Zhu S. L. Santangelo I. Manfredi P. Monti L. M. et Rao R. (1998)** Identificazione di marcatori AFLP per distinguere la cultivar "Annurca" tradizionale dai tipi "Annurca-simili". *Frutticoltura* 6: 69-71.