

Biologie de la reproduction et ressources génétiques chez le cyprès de Duprez

Cupressus dupreziana

C. Pichot¹

M. El Maâtaoui²

Introduction

Le genre *Cupressus* (Cupressacées) est constitué de 25 espèces uniquement présentes dans la zone tempérée chaude de l'hémisphère nord (fig. 1), depuis la côte ouest d'Amérique du nord jusqu'à la côte est de la Chine en passant par le bassin méditerranéen (Ducrey *et al.*, 1999). Ces espèces montrent globalement une grande plasticité vis-à-vis des conditions édaphiques, certaines font également preuve d'une remarquable tolérance vis-à-vis de la sécheresse. Des trois espèces méditerranéennes, le cyprès vert (*Cupressus sempervirens* L.) également nommé cyprès de Provence ou de Florence est le plus répandu. Il offre une très grande diversité notamment en terme de forme et est utilisé à des fins ornementales, en brise-vent ou encore en tant qu'arbre forestier. Les deux autres cyprès médi-

¹ Unité de recherches forestières méditerranéennes Inra, av. Vivaldi, 84000 Avignon, France.

² Faculté des sciences, université d'Avignon, 33 rue Pasteur, 84000 Avignon, France.



Figure 1

Aires de répartition des différentes espèces de cyprès. On distingue trois groupes : les cyprès américains, les cyprès asiatiques et les cyprès méditerranéens dont *Cupressus dupreziana* A. Camus, espèce réduite à 231 arbres dans le désert du Tassili N'Ajjer en Algérie.

terranéens sont originaires d'Afrique du Nord. Le cyprès de l'Atlas (*Cupressus atlantica* Gaussen) est endémique du Haut Atlas occidental du Maroc où il constitue des peuplements assez dégradés et parfois réduits à quelques arbres. Enfin le cyprès de Duprez (*Cupressus dupreziana* A. Camus) se rencontre naturellement dans le désert du Tassili N'Ajjer (Algérie) et représente une des espèces les plus menacées au monde (Dobr, 1988). Un récent inventaire (Abdoun, comm. pers.) fait état de 231 arbres survivants dans cette région désertique où la pluviométrie annuelle est d'environ 20 mm. Le fort recul de l'espèce semble due à la conjonction de deux facteurs : une forte pression anthropique et évolution défavorable du climat. Les arbres encore en vie sont généralement très âgés et occupent des sites difficiles d'accès. D'autre part, l'étude de graines récoltées dans l'aire naturelle algérienne ou en plantation conservatoire en France met en évidence une très faible proportion de graines normalement constituées, généralement moins de 10 % (Pichot *et al.*, 2000). Ceci suggère un dysfonctionnement du système reproducteur de l'espèce pouvant contribuer à la faible régénération naturelle observée *in situ*. De récents travaux portant sur les caractéristiques des graines nous ont permis de montrer que les noyaux de l'endosperme de *C. dupreziana* présentaient une importante variabilité de leur teneur en ADN correspondant à plusieurs niveaux de ploïdie (Pichot *et al.*, 1998). Contrairement aux deux

autres cyprès méditerranéens (*C. sempervirens* et *C. atlantica*) chez lesquels des niveaux pairs et impairs (1C, 2C, 3C, 4C, 5C...) avaient déjà été mis en évidence dans ce tissu (Pichot et El Maïtaoui, 1997), seuls des niveaux pairs (2C, 4C, 6C...) sont observés chez *C. dupreziana*. Chez les gymnospermes, l'endosperme est supposé haploïde car il est issu du développement du mégagamétophyte lui même ayant pour origine une des mégaspores produites lors de la méiose (Singh, 1978). L'absence de noyaux haploïdes dans l'endosperme de *C. dupreziana* pose le problème de l'origine et/ou des caractéristiques des gamètes femelles habituellement formés au niveau des archégonies du mégagamétophyte. Enfin, l'analyse isoenzymatique d'embryons (et d'endospermes) extraits de graines issues de pollinisation libre nous a conduit à formuler l'hypothèse d'une origine strictement paternelle de l'embryon (Pichot *et al.*, 2000). Cette hypothèse nous a amené à étudier ici la microsporogénèse et les caractéristiques des grains de pollen produits par cette espèce.

■ Matériels et méthodes

Matériel végétal

Les échantillons étudiés ont été prélevés sur deux *C. dupreziana* âgés d'environ 20 ans installés dans une plantation conservatoire du sud est de la France (massif des Maures). Des échantillons témoins ont également été prélevés sur un cyprès vert (*C. sempervirens*), espèce présentant une reproduction sexuée conforme.

Microsporogénèse

Les cônes mâles ont été récoltés et fixés une fois par semaine de septembre à janvier. Cette période englobe les principaux stades ontogéniques de la microsporogénèse et de la maturation du pollen. Les observations histologiques ont été réalisées à partir de micro-

sporangies extraits des cônes mâles et préparés selon les procédures précédemment décrites (El Maâtaoui et Pichot, 1999).

Caractéristiques du pollen mature

Le diamètre des grains de pollen imbibés dans de l'eau distillée (30 mn) a été estimé au microscope optique. Des grains de pollen matures ainsi que du pollen en germination (à 3 et 10 jours) ont été observés en microscopie à fluorescence par coloration au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), fluorochrome de l'ADN. La germination du pollen a été obtenue par mise en culture de microsporangies matures sur milieu gélosé (0,7 % agarose, 20 % saccharose).

Quantité d'ADN

La quantité relative d'ADN nucléaire (ADNn) des grains de pollen matures et en germination ainsi que celle des tissus somatiques (témoins diploïdes) ont été estimées par cytométrie en flux. L'intensité de fluorescence des noyaux est directement proportionnelle à leur quantité d'ADN et est exprimée en unité relative « C » qui correspond au génome haploïde. Les échantillons ont été préparés en utilisant le kit PARTEC (Münster, Germany) Type T (Fluorochrome : DAPI). La fluorescence des noyaux a été estimée par l'intermédiaire du cytomètre « PARTEC Ploidy Analyser PA ». Les données, enregistrées sous forme d'histogrammes, ont été traitées par le logiciel WINMDI (version 2.7, copyright ©93-98 Joseph Trotter).

■ Résultats

Microsporogenèse

Les observations microscopiques montrent que les microsporangies de *C. dupreziana* se développent conformément au schéma décrit

chez les Cupressacées (Biswas et Johri, 1997). Ceux-ci, portés par les microsporophylles, présentent une couche épidermique, un tapis et un tissu sporogène (fig. 2 a). Les tous premiers stades de la méiose jusqu'à la prophase I apparaissent également conformes. En revanche, pour des raisons de mauvais appariements et de fuseaux défectueux, la migration des chromosomes s'avère fortement perturbée. Il en résulte, à partir d'une cellule mère, la formation d'un nombre variable de microspores (monades, diades, triades, tétrades et polyades) (fig. 2 b-d) avec des noyaux de tailles souvent inégales voire inexistant (cytoplastes).

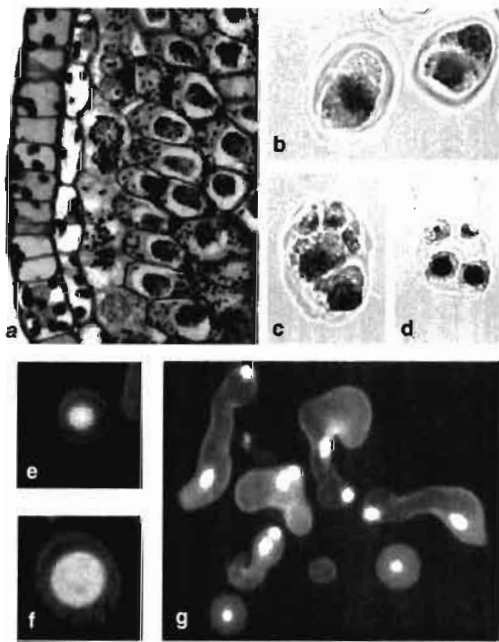


Figure 2

Aspects cytologiques de l'ontogenèse du pollen chez *C. dupreziana*.

a : coupe d'un microsporangie montrant de gauche à droite : l'épiderme, le tapis et le tissu sporogène.

b : exemples de monade (à gauche) et de diade (à droite) produites lors de la sporogénèse.

c : exemple de polyade à 5 microspores.

d : exemple de tétrade avec des microspores présentant des noyaux de tailles différentes.

e, f : grains de pollen matures de *C. sempervirens* et de *C. dupreziana* respectivement.

La fluorescence des noyaux due à la coloration par le DAPI permet de visualiser l'importante différence de taille.

g : grains de pollen de *C. dupreziana* en germination et colorés au DAPI.

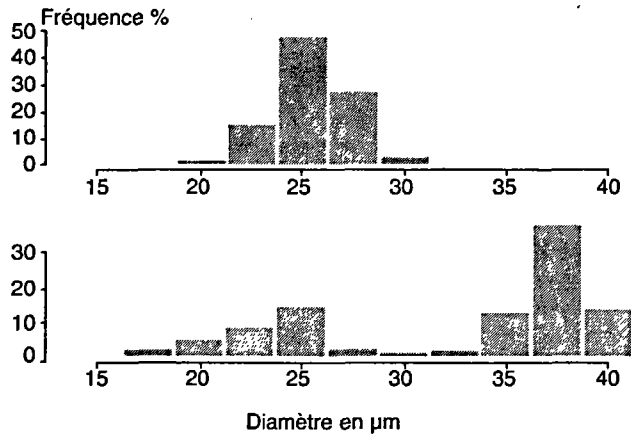
Les grains germés présentent 2 noyaux.

Caractéristiques du pollen mature

Le pollen mature de *C. dupreziana* présente des grains très hétérogènes comprenant des grains uninucléés et des grains sans noyaux. Les grains de pollen de *C. sempervirens* utilisé en tant que témoin,

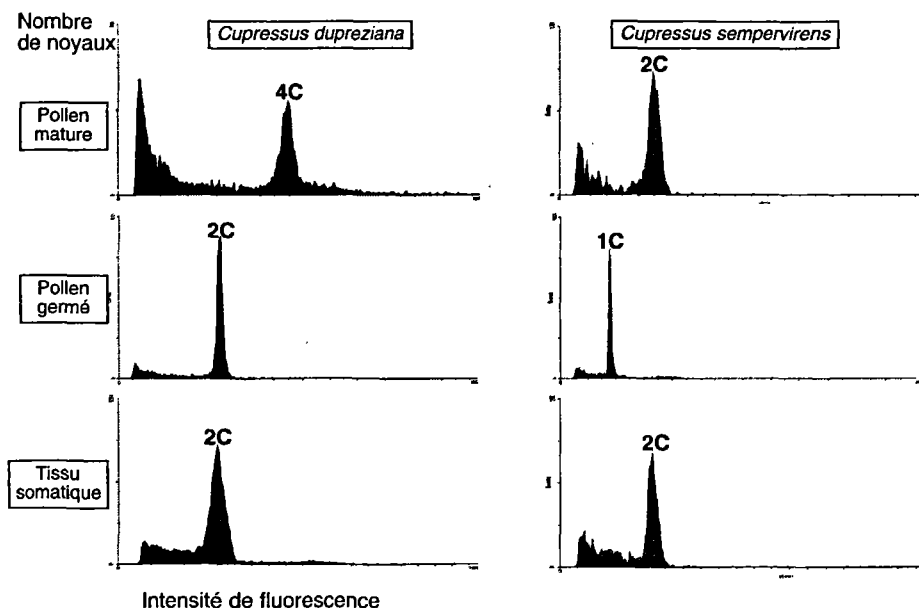
également uninucléés, ont un diamètre d'environ 26 μm et montrent une distribution unimodale (fig. 3). En revanche, chez *C. dupreziana*, l'histogramme des diamètres présente 2 modes (fig. 3). Les deux tiers des grains ont une grande taille (> 30 μm), nettement supérieure à celle du pollen de *C. sempervirens*. Ceci est corroboré par les observations en microscopie en fluorescence après coloration au DAPI (fig. 2 e-f).

Figure 3
Histogrammes de répartition des diamètres des grains de pollen matures de *C. sempervirens* (en haut) et de *C. dupreziana* (en bas). Le pollen de *C. dupreziana* est hétérogène et contient une majorité de très gros grains (environ 38 μm), les plus gros du genre *Cupressus*.



Quantité d'ADN

Tous les échantillons analysés (pollen et tissu somatique) montrent un seul pic de fluorescence (fig. 4). Les pics produits par les noyaux extraits des tissus somatiques des 2 espèces correspondent à la quantité d'ADN de référence 2C. Leurs positionnements identiques traduisent des tailles de génome semblables. Les noyaux extraits du pollen mature de *C. sempervirens* ont également la même quantité d'ADN (2C), tandis que le pic de fluorescence produit par le pollen de *C. dupreziana* se positionne à 4C. Pour les deux espèces la quantité d'ADN du pollen en germination est la moitié de celle du pollen mature (respectivement 1C et 2C pour *C. sempervirens* et *C. dupreziana*). Ceci révèle que pour les deux espèces le pollen mature est arrêté en phase G2. Au début de la germination la mitose conduit à la production de 2 noyaux (fig. 2 g).



■ Figure 4

Quantité d'ADN des noyaux des grains de pollen et des tissus somatiques de deux espèces de cyprès méditerranéens : *C. dupreziana* (première colonne) et *C. sempervirens* (seconde colonne). Les histogrammes représentent le nombre d'événements (noyaux en ordonnée) par niveau d'intensité relative de fluorescence (abscisse) DAPI. Pour chaque pic, la fluorescence moyenne est exprimée en unité « C » (quantité d'ADN du génome haploïde). Le pollen mature de *C. dupreziana* produit un pic de fluorescence à 4C, celui de *C. sempervirens* montre un pic à 2C identique à ceux obtenus à partir des tissus somatiques. Pour les deux espèces, les noyaux extraits du pollen en germination produisent respectivement des pics à 2C et 1C. Ces résultats montrent que pour les deux espèces le pollen mature est arrêté en phase G2 et que celui de *C. dupreziana* est non réduit.

■ Discussion

L'étude de la microsporogénèse et du pollen chez *C. dupreziana* nous a permis de montrer que des anomalies de méiose conduisent à

la formation de grains de pollen anormaux. Plusieurs types de grains de pollen sont observés en fonction de la nature des anomalies. La majorité du pollen est constitué de gros grains dont la taille (environ 38 μm) dépasse nettement celle du pollen des autres espèces du genre *Cupressus*. Cette particularité n'avait jusqu'à présent pu être expliquée (Gaussen, 1968). Chez les gymnospermes, de rares cas de microsporogenèse anormale avaient été signalés chez deux autres espèces : *Picea abies* (Andersson, 1947) et *Pinus sylvestris* (Runquist, 1968) mais, à notre connaissance, la production de pollen viable diploïde n'avait jamais été décrite. En revanche, chez les angiospermes la production de pollen non réduit se rencontre assez fréquemment (Bretagnolle et Thompson, 1995) et est considérée comme l'un des principaux mécanismes conduisant à l'apparition naturelle d'espèces polyploïdes. Cependant, à l'échelle d'une espèce, la production de pollen viable non réduit reste un phénomène sporadique, contrôlé par des facteurs génétiques et environnementaux (Ramsey et Schemske, 1998). Chez *C. dupreziana*, nos observations montrent des aberrations systématiques de la méiose qui conduisent à du pollen constitué de grains non fonctionnels et de grains viables non réduits. Sous réserve d'une validation à l'ensemble de l'espèce, l'absence d'individus susceptibles de produire du pollen réduit compromettrait les possibilités d'une reproduction sexuée conforme. D'autre part, tous les embryons de *C. dupreziana* étudiés se sont révélés diploïdes ce qui exclu la fécondation entre gamètes mâles non réduits et gamètes femelles (réduits ou non réduits). Ces observations permettent de conforter l'hypothèse précédemment émise d'une apomixie paternelle (Pichot *et al.*, 2000) dans laquelle l'embryon dériverait du développement du pollen dans les structures reproductrices femelles.

L'origine de ce mode particulier de reproduction doit être recherché dans le contexte écologique propre à cette espèce. Si le processus d'extinction actuel de *C. dupreziana* semble indéniablement lié à l'évolution des conditions environnementales et à la surexploitation des peuplements, il apparaît par ailleurs directement connecté à l'évolution régressive du système reproducteur. La sélection d'un tel mode de reproduction pourrait être attribuée à l'effet dépressif de la consanguinité qui intervient dans le cas de populations à faibles effectifs et géographiquement isolées. Bien que des plantations conservatoires aient été installées dans quelques pays, la survie de l'espèce et la valorisation de ses ressources génétiques restent problématiques. Dans cet

objectif, la réelle diversité génétique de l'espèce, aujourd'hui réduite à 231 arbres, mériterait d'être évaluée. Elle pourrait être particulièrement réduite en raison du système de reproduction de type apomictique ici mis en évidence. Le caractère diploïde du pollen permet difficilement d'envisager son utilisation dans le cadre d'hybridations interspécifiques avec les autres espèces de cyprès, à notre connaissance, toutes diploïdes. Enfin, les gènes contrôlant des caractères d'intérêt majeur tel que la résistance à la sécheresse ou la production de gamètes non réduits mériteraient d'être transférés à d'autres espèces.

Bibliographie

- Andersson E 1947 —
A case of asyndesis in *Picea abies*.
Hereditas 33 : 301-347.
- Biswas C, Johri BM 1997 —
The gymnosperms. Springer, Berlin.
- Bretagnolle F, Thompson JD 1995 —
Gametes with the somatic chromosome
number: mechanisms of their formation
and role in the evolution of autopolyploid
plants. *New Phytol* 129 : 1-22.
- Dobr J 1988 —
Cupressus dupreziana.
Threatened Plants Newslett 20 : 8.
- Ducrey M, Brofas G,
Andréoli C, Raddi P 1999 —
Genus *Cupressus*. In *Cypress:*
A practical handbook.
E Teissier Du Cros *et al.*
Studio Leonardo, Florence, 9-25.
- El Maâtaoui M, Pichot C 1999 —
Nuclei and cell fusion cause
polyploidization in the megagametophyte
of common cypress, *Cupressus*
sempervirens L. *Planta* 208 : 345-351.
- Gaussen H 1968 —
Les Gymnospermes actuelles
et fossiles. In *Trav. Lab. Forest.*,
fascicule X, chap. XIII, Toulouse.
- Pichot C, El Maâtaoui M 1997 —
Flow cytometric evidence for
multiple ploidy levels in endosperm
of some gymnosperm species.
Theor Appl Genet 94 : 865-870.
- Pichot C, Borrut A,
El Maâtaoui M 1998 —
Unexpected DNA content in the
endosperm of *Cupressus dupreziana*
A. Camus seeds and its implications
in the reproductive process.
Sex Plant Reprod 11 : 148-152.
- Pichot C, Fady B, Hochu I 2000 —
Lack of mother tree alleles
in zymograms of *Cupressus*
dupreziana A. Camus embryos.
Ann For Sci 57 : 17-22.
- Ramsey J, Schemske DW 1998 —
Pathway, mechanisms,
and rates of polyploid formation
in flowering plants.
Ann Rev Ecol System 29 : 467-501.
- Runquist EW 1968 —
Meiotic investigation in *Pinus*
sylvestris (L.). *Hereditas* 60 : 71-128.
- Singh H 1978 —
Embryology of gymnosperms.
Gebrüder Borntraeger, Berlin.