

Génotypage d'une collection tunisienne de palmier dattier par les marqueurs microsatellites

Salwa Zehdi

Généticienne/biologiste moléculaire

Norbert Billotte

Généticien

Soumaya Rhouma

Généticienne/biologiste moléculaire

Mokhtar Trifi

Généticien/biologiste moléculaire

Emira Chérif

Généticienne/biologiste moléculaire

Jean-Christophe Pintaud

Botaniste

Introduction

Les oasis tunisiennes sont caractérisées par une richesse génétique considérable comme en témoigne la présence d'au moins 250 cultivars répertoriés (Rhouma, 1994). Cependant, avec l'évolution économique et sociale du pays, les palmeraies de Djérid et de Nefzaoua sont réorganisées pour satisfaire une demande sans cesse croissante en dattes de qualité supérieure à l'instar du cultivar « élite » Deglet Nour. Cette réorganisation a fait que la phoéniculture est passée d'un système de culture traditionnelle riche et diversifié à un système industriel axé sur une culture monovariétale (Rhouma, 2005). Il est donc impératif d'élaborer diverses actions visant la sauvegarde de ces ressources phytogénétiques. Dans cette optique, l'identification variétale constitue l'une des composantes essentielles pour une gestion rationnelle du patrimoine phoénicole. En effet, l'exploration des potentialités de chaque cultivar, ainsi que l'établissement

d'une clé d'identification, constitue un outil précieux pour le contrôle des rejets et des vitroplants de palmier dattier. Pour ce faire, nous avons exploité les marqueurs microsatellites chez cette espèce.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Au cours de ce travail, nous avons utilisé 102 écotypes tunisiens de palmier dattier. Il s'agit de 28 pollinisateurs et de 74 cultivars. Notons que quelques variétés étrangères récemment introduites dans les palmeraies tunisiennes ont été également analysées au cours de cette étude.

Le matériel végétal, constitué de jeunes palmes prélevées sur des palmiers adultes, nous a été aimablement fourni par le Centre régional de recherche en agriculture oasisienne phoénicioles, CRRAO, Degache, situé au sud du pays.

Extraction de l'ADN cellulaire total

Afin d'extraire de l'ADN de bonne qualité, nous avons utilisé le kit « DNA easy plant mini kit », et adopté le protocole préconisé par le fournisseur (Qiagen, France).

Amorces et réaction de polymérisation enzymatique en chaîne

Nous avons utilisé les oligonucléotides identifiés au Cirad de Montpellier (Billotte *et al.*, 2004). La réaction de polymérisation enzymatique en chaîne ou PCR est réalisée dans une microplaque de 96 puits contenant chacun le mélange réactionnel suivant : 20 ng d'ADN matrice, 1 pmol d'amorce sens, 4 pmol d'amorce anti-sens, 0,2 mM d'un mélange de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 2 µl de tampon

Taq et 1 unité de *Taq* DNA polymerase (Sigma). L'amorce anti-sens est marquée à l'extrémité 5' par l'un des trois fluorophores (6FAM, NED or HEX).

La PCR est réalisée dans un thermocycler EppiMotion 96 (Eppendorf) programmé pour effectuer les cycles suivants : une incubation préalable à 94 °C, suivie de 30 cycles comportant chacun les trois étapes suivantes : une dénaturation pendant 30 secondes à 94 °C, une hybridation pendant 30 secondes à la température d'hybridation du couple d'amorces et une synthèse pendant 30 secondes à 72 °C. Une extension finale à 72 °C pendant 5 min a été toujours programmée à la fin du dernier cycle d'amplification.

Les produits d'amplification sont identifiés à l'aide d'un séquenceur automatique ABI prism 3130xl en mélangeant 3 µl du produit PCR dilué, 6,875 µl de formamide et 0,125 µl GenSize 400HD Rox. L'analyse est réalisée en utilisant le logiciel GeneMapper V3.7 *software* (Applied Biosystems).

Résultats

Au total, 136 allèles ont été mis en évidence avec un nombre moyen de 9,14 allèles par locus. Ce résultat traduit l'existence d'une importante diversité au sein de la palmeraie tunisienne. En outre, tenant compte de tous les allèles identifiés, nous avons pu établir les empreintes génétiques de toutes les accessions étudiées. Ces empreintes correspondent aux génotypes multilocus mis en évidence au cours de cette étude.

Ainsi, en considérant seulement cinq locus microsatellites nous avons déterminé les génotypes multilocus propres à chacun des différents écotypes. Le diagramme illustrant la clé d'identification variétale ainsi obtenue est consigné dans la figure 1. Il en ressort que le pourcentage d'efficacité est de 100 %. Ce résultat témoigne de la puissance des marqueurs microsatellites pour le typage moléculaire dont les apports sont très précieux tant sur le plan de la certification à grande échelle des rejets (vendus et/ou échangés) par les phéoniculteurs que pour le test de conformité des vitroplants.

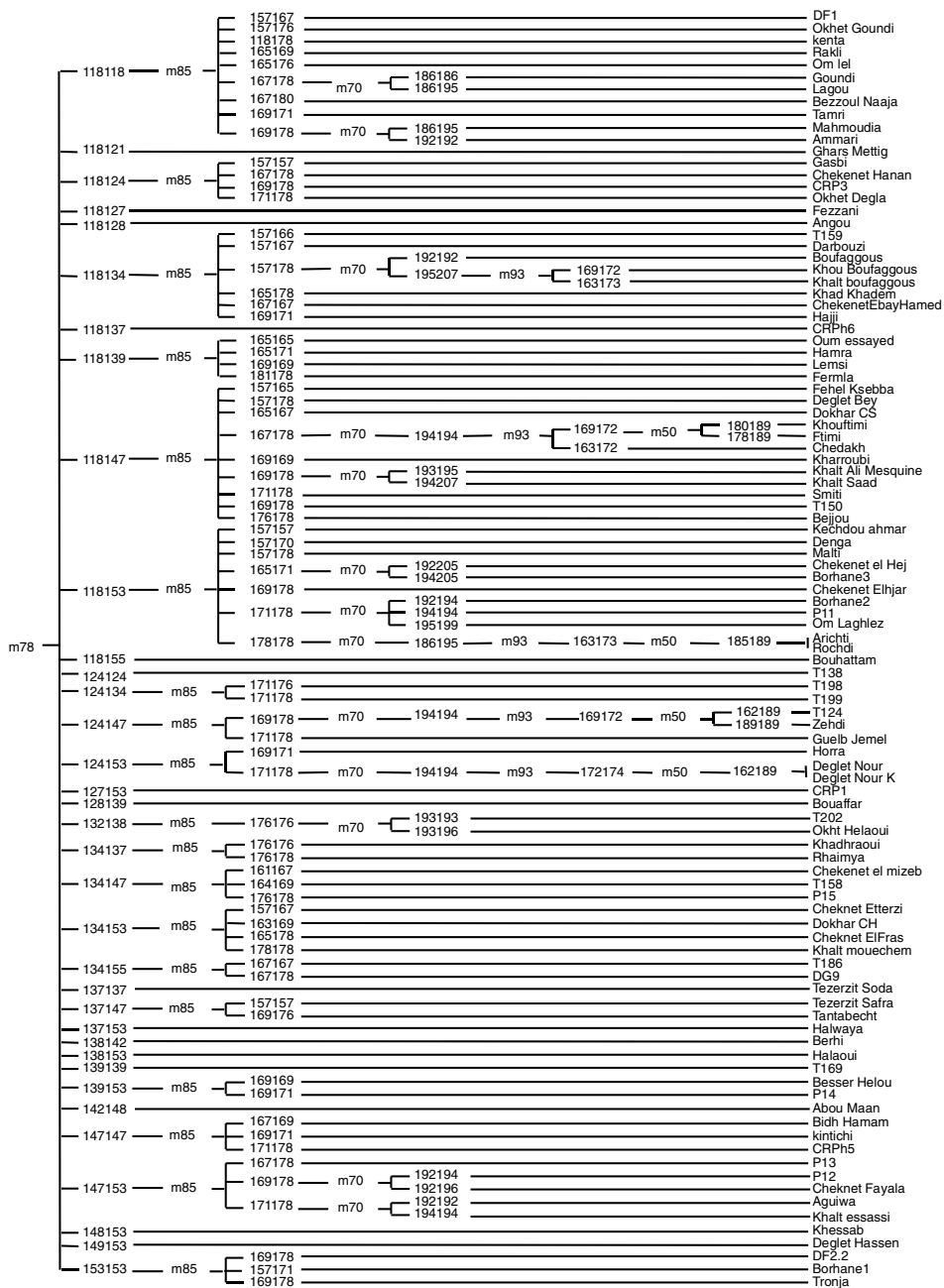


Figure 1
Diagramme illustrant la clé d'identification variétale.

Établissement de la clé d'identification

Dans le but d'établir la clé d'identification variétale, nous nous sommes basés sur le principe de la classification hiérarchisée des locus selon le nombre d'allèles identifiés pour chacun d'entre eux. Les accessions sont par la suite ordonnées en regroupant celles qui possèdent le même génotype, et ce jusqu'à l'obtention de la combinaison allélique propre à chacune d'entre elles.

Conclusions et discussion

Dans ce travail, nous nous sommes proposés d'explorer la diversité génétique de la palmeraie tunisienne en nous basant sur les marqueurs microsatellites. Ainsi, nous avons pu dans une première étape mettre en évidence une conformité intracultivar en utilisant des accessions issues d'origines oasiennes différentes. En conséquence, nous pouvons suggérer que toutes les plantes d'une variété donnée, sont identiques entre elles et qu'elles dérivent les unes des autres à partir d'une même plante mère pour constituer un clone. Cette considération est en accord avec le mode de reproduction chez cette espèce. En effet, le palmier dattier est multiplié végétativement à l'aide des rejets qui sont constamment échangés entre les phoéniculteurs. Il en résulte une forte homogénéité variétale aussi bien à l'intérieur d'une même palmeraie qu'à travers les différentes oasis. Toutefois, les facteurs environnementaux ainsi que certaines mutations pourraient se produire tout en étant à l'origine des variations observées et qui concernent les caractères végétatifs de la plante et/ou ceux des fruits. Dans ce cas, le mode de sélection pratiqué par les phoéniculteurs, aura comme effet d'éliminer ces variations dès leur apparition.

Dans une seconde étape, nous avons pu mettre à profit les possibilités offertes par les marqueurs microsatellites afin d'examiner la diversité génétique de la palmeraie tunisienne et d'établir le typage moléculaire de 102 accessions différentes. Les résultats obtenus témoignent aussi bien de la richesse de ce patrimoine phytogéné-

tique que de l'efficacité de la technique SSR en termes de mise en évidence du polymorphisme moléculaire chez le palmier dattier. D'ailleurs, l'exploitation des données issues de cette étude montre qu'il est possible d'identifier spécifiquement toutes les accessions analysées grâce à leur empreinte génétique. Ainsi, le génotypage multilocus nous a permis de construire une clé d'identification variétale avec une efficacité absolue (100 %), et ce en nous basant uniquement sur cinq locus. Les travaux sont en cours de réalisation afin d'élargir cette étude à tout le germoplasme tunisien de palmier dattier afin d'établir les empreintes génétiques de notre patrimoine phoenicicole. Les retombées de ces différentes actions seront d'un grand apport pour le typage moléculaire des variétés ainsi que pour le contrôle de la conformité des rejets et/ou des vitroplants produits industriellement par les diverses techniques de culture *in vitro*.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier l'équipe de recherche de l'UMR « Diversité et adaptation des plantes cultivées » de l'IRD Montpellier et de l'Inra Montpellier pour leur aide et leur soutien.

Bibliographie

- | | |
|--|---|
| BILLOTTE N., MARSEILLAC N.,
BROTTIER P., NOYER J. L.,
JACQUEMOUD-COLLET J. P., MOREAU C.,
COUVREUR T., CHEVALLIER M. H.,
PINTAUD J.-C., RISTERUCCI A. M., 2004 –
Nuclear microsatellite markers for
the date palm (<i>Phoenix dactylifera</i> L.):
characterization, utility across the genus
<i>Phoenix</i> and in other palm genera.
<i>Molecular Ecology Notes</i> , 4 : 256-258. | RHOUMA A., 1994 –
<i>Le palmier dattier en Tunisie.</i>
<i>Le patrimoine génétique.</i>
Inra de Tunisie.
Pnud/FAO/RAB/88/024

RHOUMA A., 2005 –
<i>Le palmier-dattier en Tunisie :</i>
<i>Le patrimoine génétique.</i>
Vol. II. Ipgri. |
|--|---|



Colloques et séminaires

Biotechnologies du palmier dattier

Éditrice scientifique
Frédérique Aberlenc-Bertossi

IRD
Éditions

Actes du 3^e Séminaire du réseau AUF-BIOVEG
« Biotechnologies du palmier dattier »
Montpellier (France), 18-20 novembre 2008

Biotechnologies du palmier dattier

Éditrice scientifique
Frédérique Aberlenc-Bertossi

IRD Éditions
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT

collection Colloques et séminaires

Paris, 2010

Préparation des textes

Sylvie Doulbeau

Mise en page

Bill Production

Fabrication

Catherine Plasse

Maquette de couverture

Michelle Saint-Léger

Maquette intérieure

Catherine Plasse

Photo de couverture

IRD/F. Aberlenc-Bertossi : « *Palmeraies, Tozeur (Tunisie).* »

La loi du 1^{er} juillet 1992 (code de la propriété intellectuelle, première partie) n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article L. 122-5, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans le but d'exemple ou d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (alinéa 1^{er} de l'article L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon passible des peines prévues au titre III de la loi précitée.

© IRD, 2010

ISSN : 0767-2896

ISBN : 978-2-7099-1691-2