

41

Identification variétale et ressources génétiques chez le figuier (*Ficus carica* L.) : utilisation des marqueurs RAPD

BOUCHAIB KHADARI¹, PHILIPPE LASHERMES², FINN KJELLBERG¹

1. CEFE-CNRS, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex, France.

2. ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex, France.

Résumé

L'identification de 21 échantillons de figuier (*Ficus carica* L.) représentant différentes variétés cultivées a été réalisée par la technique RAPD (random amplified polymorphism DNA). Des amorces donnant des résultats reproductibles et révélant du polymorphisme au sein d'un sous-ensemble de quatre génotypes ont été préalablement sélectionnées. 19 marqueurs sont obtenus par l'utilisation de 12 amorces et ont permis de caractériser 17 génotypes. L'analyse a mis en évidence une erreur d'étiquetage pour un échantillon et une synonymie pour deux autres. La reproductibilité des résultats, la stabilité au sein d'un clone et le polymorphisme suffisamment élevé font de ces marqueurs un outil efficace pour l'identification variétale chez le figuier. Les génotypes étudiés ont une base génétique relativement large sans différenciation en sous-groupes distincts, probablement sous l'effet d'un brassage de gènes important en populations naturelles. Les marqueurs identifiés dans cette étude pourraient servir pour l'analyse de la diversité génétique d'un plus grand nombre de variétés cultivées et des populations naturelles de *Ficus carica*.

20 DEC. 1995



O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° 43 194

Cote BM ex 1

P22

Ficus carica L. est une espèce gynodioïque qui se reproduit spontanément dans la région circum-méditerranéenne. Il existe deux formes sexuelles : 1) le figuier domestique ne produit que des graines, ses fleurs mâles sont stériles ; 2) le caprifigier abrite l'insecte-pollinisateur, *Blastophaga psenes*, sous forme de larve dans les ovaires des fleurs femelles et produit du pollen [20]. Cette espèce est abondamment cultivée sur le pourtour méditerranéen car elle produit des figues qui sont, pour la plupart, comestibles. La production est commercialisée sous forme de figues fraîches ou séchées. Les figues, pour être séchées, nécessitent une teneur en sucre élevée qui ne peut être obtenue que par pollinisation, alors que les figues fraîches sont produites, en majeure partie, par des variétés parthénocarpiques ne nécessitant pas de pollinisation. La culture du figuier s'est toujours accompagnée d'une connaissance plus ou moins précise de variétés de cette espèce. Une variété de figuier regroupe tous les individus qui sont issus d'un même génotype par multiplication végétative. Ce génotype, généralement prélevé directement dans la nature, est choisi pour ses caractères agronomiques (grosses figues charnues s'il s'agit de figues fraîches ou bien sucrées dans le cas de figues séchées, production importante de figues,...). Beaucoup de collections de variétés de figuier sont maintenues par des pépiniéristes qui sont confrontés à des erreurs d'identification et à des synonymies. Il est donc nécessaire de disposer de moyens permettant l'identification des variétés qui sont rassemblées au sein d'une collection.

Le moyen classique d'identification des génotypes est basé sur les caractères morphologiques. Utilisant des critères comme la taille et la forme du fruit et de la feuille, la couleur de l'épiderme, etc., Condit [10] a pu classer un peu plus de 600 variétés de figuiers. Néanmoins, ces caractères sont le plus souvent sous l'influence des conditions du milieu [9] et, en général, ne correspondent pas à des critères alternatifs qui permettent de séparer les phénotypes en groupes distincts bien définis [32]. Plusieurs travaux ont utilisé le polymorphisme protéique comme moyen d'identification des variétés [3, 2, 35]. L'étude de 61 variétés de figuiers à l'aide de 4 loci polymorphes a permis de distinguer 41 spectres alloenzymatiques différents dont certains sont communs à 2 variétés ou plus [33]. Le succès de l'identification des génotypes par les marqueurs enzymatiques est conditionné par le nombre de systèmes enzymatiques et d'allèles étudiés. Ce nombre étant souvent limité, il ne permet pas d'avoir un polymorphisme suffisamment important pour caractériser l'ensemble des variétés [2, 30, 33, 35]. De plus, comme les protéines sont des produits d'expression des gènes, elles peuvent varier selon l'organe, le tissu, le stade de développement ou même selon les conditions du milieu [4]. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction obtenu par l'utilisation de sondes minisatellites [11, 29] ou de sondes microsatellites [36] permet d'identifier avec succès les génotypes, même dans le cas d'une base génétique étroite. Cependant, cette technique reste très laborieuse à mettre en œuvre et nécessite souvent l'emploi de la radioactivité.

Récemment, une technique basée sur l'amplification en chaîne par polymérisation ou PCR (*polymerase chain reaction*) nommée *random amplified polymorphism DNA* (RAPD) a été développée par Williams *et al* [41] et par Welsh and McClelland [37]. Les amorces utilisées sont des séquences arbitraires et peuvent s'hybrider à de l'ADN répété, comme à des séquences de faible nombre de copies [39, 41]. Les marqueurs obtenus par cette technique ont généralement une transmission mendélienne [7, 18]. Ils peuvent être utilisés comme marqueurs d'introgession [1] ou dans certains cas pour déterminer la paternité et les relations de parenté entre individus [15, 38]. Par ailleurs, ils sont utilisés dans la construction des cartes de liaison génétique [21, 31]. Cette technique n'est pas limitée par le nombre d'amorces et permet d'identifier fréquemment le

polymorphisme qui existe entre individus étudiés. Elle offre le moyen d'étudier la variabilité génétique au sein d'un complexe d'espèces [24, 40], dans les populations naturelles d'une même espèce [8, 17, 26, 34] ou pour caractériser les différents génotypes [16, 22, 39, 44].

Le nombre croissant des travaux réalisés à l'aide des marqueurs RAPD laisse à penser qu'ils seraient un moyen adapté à l'étude de la variabilité génétique de *Ficus carica*. Ce travail consiste à rechercher et à caractériser des marqueurs RAPD en vue d'identifier les différents génotypes qui sont présents au sein d'un ensemble d'échantillons de figuiers. Notre objectif est de montrer que l'application de la technique RAPD à l'identification des variétés de figuiers est possible, et de disposer d'un ensemble de marqueurs pour étudier, par la suite, la variabilité génétique des populations naturelles de cette espèce.

Matériel et méthode

Matériel végétal

L'étude est réalisée sur 21 échantillons de figuiers représentant 19 dénominations distinctes. Il s'agit d'un sous-ensemble représentatif des collections qui sont maintenues par les pépiniéristes en France, qui correspond à des variétés, économiquement, parmi les plus importantes. Ce matériel provient de quatre sites différents : les pépinières Baud (Vaison-la-Romaine), la collection variétale de Porquerolles (conservatoire botanique), un producteur de Perpignan et enfin le CEFECNRS de Montpellier (Tableau I).

Cinq échantillons représentant trois dénominations différentes sont particulièrement choisis pour cette étude. Il s'agit de Col de Dame blanche, Col de Dame grise et Col de Dame noire, ayant une même forme de réceptacle. Ces trois variétés correspondent au figuier domestique sans récolte de printemps ; elles partagent un même spectre alloenzymatique constitué par 4 loci polymorphes [33]. Elles ont toutes les mêmes caractères morphologiques, seule la couleur de l'épiderme des figues les différencie. Il s'agit très certainement d'un génotype unique et la différence de couleur notée serait le résultat de mutations somatiques maintenues par la multiplication végétative [33]. Pour chacune des deux variétés Col de Dame blanche et Col de Dame noire, l'analyse est réalisée sur deux échantillons provenant l'un de la collection variétale de Porquerolles, et l'autre de la zone traditionnelle de culture de ces variétés à Perpignan. Les deux échantillons d'une même variété ont ainsi été multipliés séparément dans deux localités géographiques différentes et ce, depuis fort longtemps. L'analyse de ces échantillons permettra de tester la stabilité des marqueurs RAPD au sein du génotype Col de Dame.

Extraction de l'ADN génomique

L'ADN est extrait selon la méthode de Dellaporta *et al* [12] à partir de bourgeons végétatifs dormants car, pendant l'hiver, le figuier est dépourvu de feuilles. Un test de comparaison entre ce type d'extraction et celui réalisé à partir de jeunes feuilles obtenues en serre montre qu'il n'existe aucune différence dans la qualité de l'ADN et les résultats obtenus. La quantité d'ADN génomique est estimée par spectrophotométrie et coloration au bromure d'éthidium après électrophorèse.

Tableau I. Liste des échantillons de figuier.

Numéro	Nom	Collection d'origine
1	Dauphine	Porquerolles
2	Violette Dauphine	Pépinières Baud
3	Col de Dame grise	Porquerolles
4	Col de Dame blanche (échantillon 1)	Porquerolles
5	Col de Dame noire (échantillon 1)	Porquerolles
6	Col de Dame noire (échantillon 2)	Perpignan
7	Bourgeassotte noire	Porquerolles
8	Violette de Sollies	Pépinières Baud
9	Marseillaise	Pépinières Baud
10	Verte d'Argenteuil	Pépinières Baud
11	Longue d'août	Pépinières Baud
12	Osborn Prolific	Pépinières Baud
13	Madeleine des deux Saisons	Pépinières Baud
14	Grise de Saint-Jean	Pépinières Baud
15	Tardive Août Turkey	Pépinières Baud
16	Sultane	Pépinières Baud
17	Noire voisine de la Sultane	Pépinières Baud
18	Grise ronde à chair rose	Pépinières Baud
19	Grosse longue verte	Pépinières Baud
20	Roscoff	CEFE-CNRS, Montpellier
21	Col de Dame blanche (échantillon 2)	Perpignan

Conditions de la PCR et de l'électrophorèse

Les amorces (Operon, USA) sont des oligonucléotides de 10 bases ayant une proportion en CG dépassant 50 % (Tableau II). La réaction d'amplification est réalisée dans un volume de 25 µl contenant 10 mM tris-HCl à pH 8,3 ; 50 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,001 % gélatine ; 100 µM pour chacun des désoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP, Boehringer), environ 10 ng d'ADN génomique ; 0,4 µM d'amorce et une unité de Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus). Ce mélange est couvert par deux gouttes d'huile minérale (Sigma) pour empêcher l'évaporation du liquide lors de la réaction d'amplification qui est conduite dans un appareil Trio-ThermoBlock (Biometra/Allemagne). La réaction de PCR commence par une étape de dénaturation durant 5 mn à 95 °C ; elle est ensuite soumise à 45 cycles. Chaque cycle comporte 1 mn à 95 °C, 1 mn à 35 °C et 2 mn à 72 °C. La réaction de la PCR se termine par une étape d'élongation finale pendant 6 mn à 72 °C. Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % dans du tampon TBE 1X à 4 volts/cm pendant environ 4 h. Ils sont ensuite visualisés au bromure d'éthidium sous lumière UV (312 nm) et photographiés avec un film noir et blanc (667, Polaroid).

Tableau II. Liste des amorces utilisées dans l'analyse.

Code	Séquence 5' — 3'	Nombre de produits d'amplification	Nombre de marqueurs RAPD
OPA11	CAATCGCCGT	3	1
OPA16	AGCCAGCGAA	3	2
OPA18	AGGTGACCGT	4	2
OPH11	CTCCGCAGT	5	2
OPK17	CCCAGCTGTG	6	2
OPX5	CCTTCCCTC	3	1
OPX9	GGTCTGGTTG	4	1
OPX11	GGAGCCTCAG	6	2
OPY4	GGCTGCAATG	3	1
OPY11	AGACGATGGG	6	2
OPY14	GGTCGATCTG	2	1
OPZ12	TCAACGGGAC	3	2

Analyse des données

Les produits d'amplification sont visualisés sur gel d'agarose sous la forme de bandes. A la suite d'un test de répétabilité, ces bandes sont codées sous la forme de présence/absence pour l'ensemble des individus analysés. La présence est notée quelle que soit l'intensité de la bande. Par commodité de langage, un marqueur RAPD est qualifié de locus à deux allèles (présence ou absence de la bande). L'analyse par ces marqueurs permet de caractériser chaque échantillon par un profil multilocus. La variation entre génotypes est évaluée en calculant l'indice de similarité de Nei et Li [27] pour l'ensemble des échantillons pris deux à deux selon la formule suivante : $S = 2 \times N_{AB} / (N_A + N_B)$ où N_{AB} est le nombre de bandes communes à l'individu A et à l'individu B, N_A et N_B correspondent respectivement au nombre de bandes de l'individu A et de l'individu B. La probabilité d'avoir un même profil multilocus pour deux individus pris au hasard peut être calculée par la moyenne de l'indice de similarité à la puissance de la moyenne du nombre de bandes par individu [29]. Les relations qui existent entre les génotypes sont illustrées par un dendrogramme construit à partir de la matrice de similarité de Nei et Li [27] en utilisant la méthode de la classification ascendante hiérarchique non pondérée sur le critère de la distance moyenne (UPGMA ; [5] et le logiciel Phylip [14].

Résultats et discussion

Sélection et validité des marqueurs RAPD

Un ensemble de 85 amorces est testé sur quatre échantillons : Dauphine, Col de Dame grise, Madeleine des deux saisons et Roscoff. Environ 25 % de ces amorces (21 au total) sont immédiatement exclues de cette étude car pour certaines, il y a absence totale

d'amplification et pour d'autres les produits d'amplification obtenus sont mal définis et difficilement interprétables. Parmi les 64 amorces retenues, 27 génèrent du polymorphisme (Figure 1). Chacune de ces amorces est ensuite testée une deuxième fois sur les quatre génotypes, puis une troisième fois sur l'ensemble des échantillons étudiés. Parmi les 14 premières amorces testées de cette manière, 12 sont retenues pour l'identification des génotypes étudiés car les produits d'amplification obtenus sont répétables à chacune de ces trois amplifications réalisées (Figure 2).

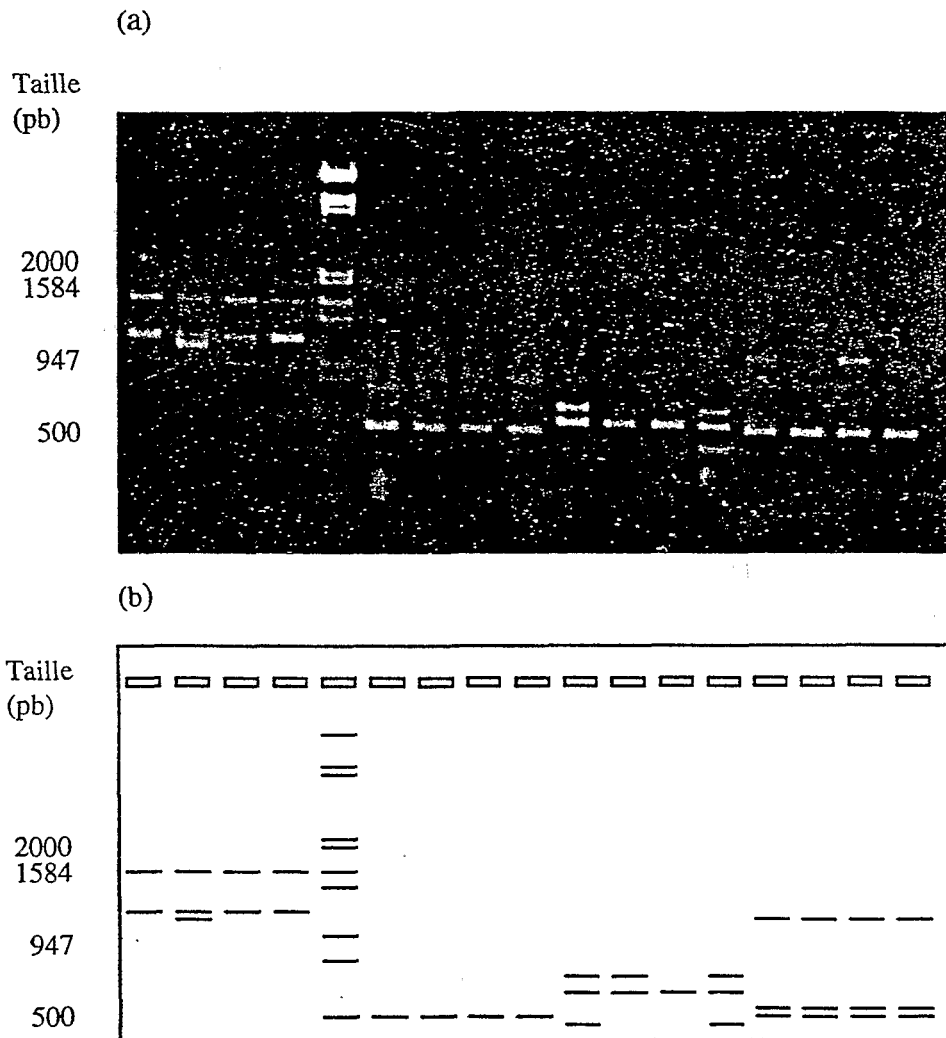


Figure 1. Exemple de sélection des amorces révélant du polymorphisme au sein de quatre génotypes (de gauche à droite : l'échantillon 20, 13, 3 et 1). Les amorces testées sont de gauche à droite : OPX5, OPX1, OPA18 et OPA9. (a) photographie du gel, (b) diagramme utilisant la présence de bandes.

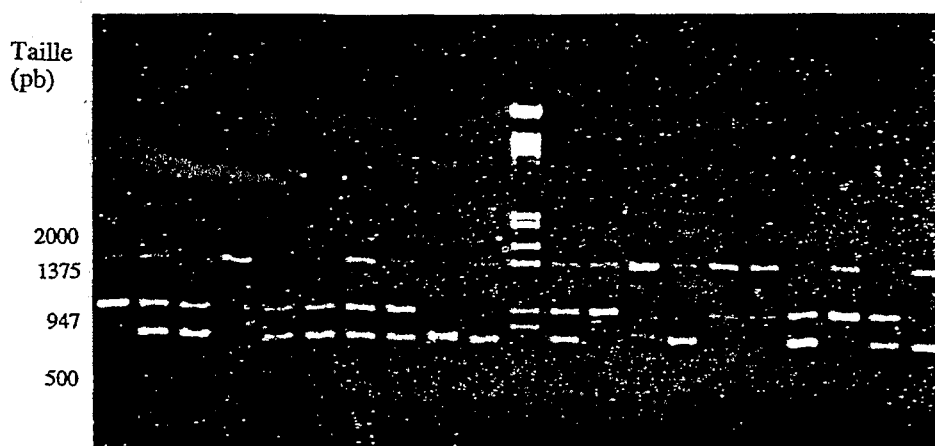


Figure 2. Exemple de produits d'amplification obtenus à partir de 20 échantillons de figuier (de gauche à droite : l'échantillon 1 jusqu'à 20) en utilisant l'amorce OPA16.

Un total de 64 produits d'amplification est obtenu par les 12 amorces utilisées dans cette étude dont 16 ne sont pas pris en compte (soit 25 % du total). 29 produits d'amplification (soit 45 % du total) sont présents chez l'ensemble des échantillons analysés, ils correspondent à des loci monomorphes. 19 produits d'amplification (soit 30 % du total) correspondent à des loci polymorphes, ils constituent l'ensemble des marqueurs RAPD utilisés pour l'identification des génotypes étudiés (Tableau II). Le nombre de produits d'amplification obtenus à l'aide d'une seule amorce varie de deux à six avec une moyenne de 4. Chacune de ces amorces permet d'avoir un à deux marqueurs RAPD (Tableau II).

L'utilisation des amorces de courte séquence rend la réaction de la PCR très sensible aux conditions de l'amplification. De ce fait, des résultats reproductibles ne sont obtenus que dans le cas où ces conditions sont optimales et strictement les mêmes pour les différentes réactions [15,42]. Les marqueurs RAPD utilisés dans cette étude sont le résultat d'une sélection sur les amorces et sur les produits d'amplification. En effet, la présence de résultats non reproductibles montre l'importance de cette sélection [45].

La possibilité d'une co-migration des fragments d'ADN amplifiés constitue, dans certains cas, une difficulté pour l'interprétation des résultats RAPD. L'utilisation de l'un des fragments amplifiés comme sonde permet par hybridation de vérifier s'il s'agit du même locus [41]. Les marqueurs utilisés dans cette analyse n'ont pas été vérifiés selon cette méthode. Cependant, nous avons montré que le marqueur OPY14 a une transmission biparentale au niveau de la génération F1 (résultats non publiés). Les autres marqueurs ne sont pas testés car ils ne sont pas polymorphes entre les deux parents étudiés. De plus, la probabilité d'avoir une co-migration pour des individus appartenant à une même espèce, comme dans ce cas, est faible [19].

Polymorphisme et identification des génotypes

L'analyse des 21 échantillons de figuier par ces marqueurs permet de distinguer 17 profils multilocus différents (Figure 3). Une même combinaison de bandes est commune à quatre échantillons de Col de Dame, à l'exception de Col de Dame blanche

provenant de Porquerolles. Les marqueurs RAPD sont donc parfaitement stables pour différents clones d'un même génotype. Cette stabilité caractérise la variété Col de Dame noire pour laquelle deux échantillons sont multipliés séparément dans deux localités géographiques différentes depuis de nombreuses années. Elle caractérise aussi les trois variétés obtenues par mutation somatique à partir d'un génotype unique Col de Dame. De la même manière, Wolff et Peters-Van Rijn [43] obtiennent un seul profil multilocus pour 13 cultivars de chrysanthèmes (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) issus d'un même clone d'origine. L'échantillon Col de Dame blanche provenant de Porquerolles est caractérisé par une combinaison de bandes très différente des autres Col de Dame. En effet, l'indice de similarité de 0,57 entre ces deux génotypes traduit une différence sur 9 marqueurs (Tableau III). Il s'agit donc d'une erreur d'étiquetage dans la collection. Quant à l'échantillon Bourgeassotte noire et Violette de Solliès qui ont le même profil multilocus, il s'agit, après une enquête réalisée auprès des responsables de collections, d'un même génotype ayant deux nominations différentes selon la provenance. La Figure 3 montre qu'aucun génotype n'est caractérisé par un seul marqueur.

Les marqueurs RAPD utilisés ont permis d'identifier l'ensemble des échantillons analysés. Cette identification est fondée par le fait que les 17 profils multilocus se distinguent par au moins trois allèles (Tableau III, Figure 3). Par ailleurs, la probabilité pour que deux individus différents partagent une même combinaison de bandes est infime, de l'ordre de $5,10^{-3}$ ($0,61^{10,67}$). L'utilisation de 19 marqueurs RAPD prévoit, dans le cas où ces marqueurs ne sont pas liés, un total de 524 288 (2^{19}) combinaisons multilocus différentes possibles. De telles possibilités sont difficilement réalisées par l'emploi des alloenzymes dont le polymorphisme est limité par le nombre de loci et d'allèles généralement faibles [2, 30, 33, 35]. Bailey [3] définit trois critères pour l'identification variétale : 1) une variabilité suffisamment importante pour distinguer les différentes variétés, 2) une variation intra-variétale minimale, 3) une reproductibilité dans les résultats. En remplissant ces trois conditions, les marqueurs RAPD utilisés dans notre étude sont donc bien adaptés à l'identification des génotypes.

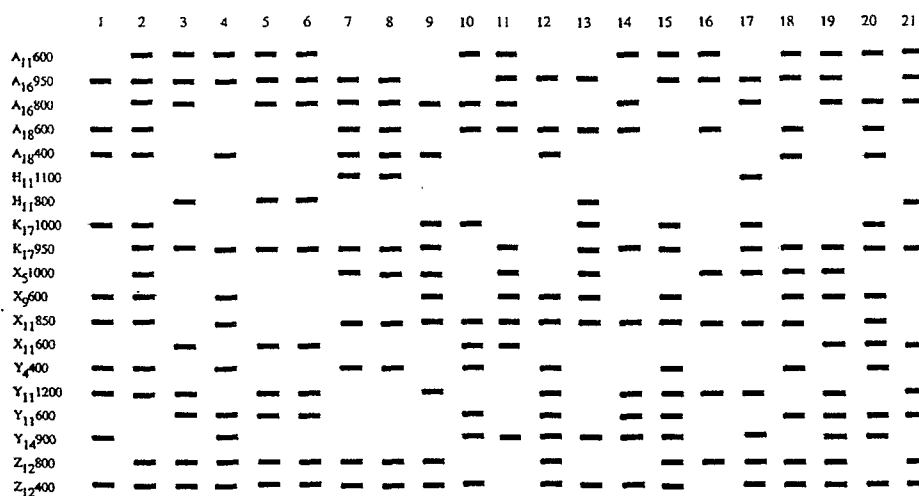


Figure 3. Diagramme illustrant les différents profils multilocus des 21 échantillons étudiés.

Tableau III. Matrice de similarité basée sur l'estimation de l'indice de similarité de Nei & Li [27]. Moyenne = 0,61, erreur standard = 0,14.

Échantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Dauphine	1,00																				
Violette Dauphine	0,75	1,00																			
Col de Dame grise	0,30	0,58	1,00																		
Col de Dame blanche (éch.1)	0,67	0,72	0,57	1,00																	
Col de Dame noire (éch.1)	0,30	0,58	1,00	0,57	1,00																
Col de Dame noire (éch.2)	0,30	0,58	1,00	0,57	1,00	1,00															
Bourgeassotte noire	0,57	0,80	0,48	0,64	0,48	0,48	1,00														
Violette de Sollies	0,57	0,80	0,48	0,64	0,48	0,48	1,00	1,00													
Marseillaise	0,60	0,83	0,50	0,57	0,50	0,50	0,67	0,63	1,00												
Verte d'Argenteuil	0,60	0,58	0,50	0,57	0,50	0,50	0,48	0,48	0,40	1,00											
Longue d'août	0,50	0,67	0,50	0,57	0,50	0,50	0,57	0,57	0,50	0,60	1,00										
Osborn Prolific	0,86	0,72	0,48	0,82	0,48	0,48	0,64	0,64	0,57	0,57	0,48	1,00									
Madeleine des deux Saisons	0,70	0,67	0,40	0,57	0,40	0,40	0,57	0,57	0,60	0,50	0,70	0,57	1,00								
Grise de Saint-Jean	0,53	0,60	0,63	0,60	0,63	0,63	0,50	0,50	0,53	0,74	0,63	0,60	0,53	1,00							
Tardive Brown Turkey	0,73	0,77	0,64	0,91	0,64	0,64	0,52	0,52	0,64	0,64	0,55	0,78	0,64	0,67	1,00						
Sultane	0,47	0,67	0,47	0,47	0,47	0,47	0,56	0,56	0,47	0,35	0,59	0,56	0,47	0,50	0,53	1,00					
Noire voisine de la Sultane	0,57	0,72	0,57	0,57	0,57	0,57	0,73	0,73	0,76	0,48	0,57	0,50	0,67	0,60	0,73	0,56	1,00				
Grise ronde à chair rose	0,64	0,85	0,54	0,91	0,54	0,54	0,78	0,78	0,64	0,54	0,64	0,78	0,63	0,57	0,75	0,63	0,52	1,00			
Grosse longue verte	0,45	0,69	0,82	0,73	0,82	0,82	0,52	0,52	0,64	0,54	0,73	0,61	0,55	0,67	0,75	0,53	0,70	0,67	1,00		
Roscoff	0,70	0,74	0,52	0,78	0,52	0,52	0,58	0,58	0,61	0,87	0,70	0,67	0,61	0,80	0,72	0,30	0,50	0,72	0,64	1,00	
Col de Dame blanche (éch. 2)	0,30	0,58	1,00	0,57	1,00	1,00	0,48	0,48	0,50	0,50	0,50	0,48	0,40	0,63	0,64	0,47	0,57	0,54	0,82	0,52	1,00

L'identification de 21 individus de figuier pourrait être réalisée par un choix de 5 à 6 marqueurs indépendants. Or, il faut au moins 17 marqueurs, puisque les deux génotypes les plus proches ($S = 0,91$) ont en commun 16 allèles (Tableau III, Figure 3). Le fait que ce nombre de marqueurs nécessaire est multiplié par un facteur de 3 suggère que certains de ces loci sont liés, et/ou qu'un sous-ensemble de combinaisons multilocus n'est pas représenté sous l'effet de l'échantillonnage. Le nombre de marqueurs à utiliser dans ce type d'étude est important puisqu'il s'agit de pouvoir séparer les différents génotypes par le minimum de marqueurs possibles afin d'économiser le coût d'analyse [23].

Variabilité génétique chez le figuier

Les 12 amorces utilisées dans cette étude ont donné 48 produits d'amplification répétables, soit 4 produits d'amplification par amorce en moyenne. Ce nombre est faible comparé à celui obtenu chez d'autres espèces [16, 22, 26, 43, 45]. L'obtention d'un tel résultat limite le nombre de marqueurs RAPD qui est en moyenne de 1,5 chez le figuier (Tableau II). Dans un cas comme le pommier où une seule amorce a donné 14 produits d'amplification [22], les 19 marqueurs peuvent être obtenus par 2 à 4 amorces contrairement aux 12 amorces utilisées dans notre étude. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en augmentant la résolution des produits d'amplification, permet d'avoir plus de marqueurs RAPD que l'électrophorèse sur gel d'agarose [6, 13].

Sur un ensemble de 85 amorces testées, 27 ont révélé du polymorphisme (soit 29 %). Ce polymorphisme est plus faible que celui obtenu chez d'autres espèces [16, 25, 39, 45]. Il était donc nécessaire de procéder à une première sélection d'amorces révélant du polymorphisme au sein d'un sous-ensemble de 4 génotypes. Cette méthode a permis d'économiser les coûts et le temps en évitant d'analyser inutilement l'ensemble des échantillons par des amorces non informatives. Néanmoins, le polymorphisme révélé par l'utilisation des amorces sélectionnées est étroitement lié à la base génétique formée par ces quatre génotypes. Il peut, de ce fait, introduire un biais dans l'analyse de la variabilité génétique de l'ensemble des échantillons. L'indice de similarité moyen pour ces 4 génotypes est de 0,54 ; il n'est guère différent de l'indice moyen pour l'ensemble des échantillons qui est de 0,61. Ces 4 génotypes constituent alors un sous-ensemble représentatif de la variabilité génétique existant au sein de l'ensemble des échantillons. De ce fait, le choix de ces génotypes n'introduit pas de biais quant à l'analyse de la variabilité.

La matrice résultant du calcul de l'indice de similarité pour l'ensemble des échantillons pris deux à deux (Tableau III) montre que cet indice varie de 0,30 à 0,91 pour les génotypes ainsi identifiés, avec une moyenne d'environ 0,61, et une variation de 23 %. Les génotypes caractérisés partagent alors une base génétique relativement large. Cependant, l'apparementement entre ces individus, illustré par le dendrogramme (Figure 4) montre qu'il n'y a pas de groupement de génotypes bien individualisés. Les travaux de Van Heusden et Bachmann [34] montrent que chez *Microseris elegans*, 10 génotypes dont chacun est caractéristique d'un biotope et d'une population, sont nettement séparés en 4 groupes, alors que leur indice de similarité ne varie que de 0,48 à 0,91 avec une moyenne de 0,64 et une variation de 20 %. Cette séparation en groupes est en rapport avec la distribution géographique des populations de *Microseris elegans* ainsi que le flux de gènes relativement limité. La variabilité génétique existant au sein des génotypes de figuier n'est pas structurée, malgré un indice de similarité qui varie de 0,30 à 0,91, probablement sous l'effet d'un important brassage de gènes.

Identification variétale et ressources génétiques

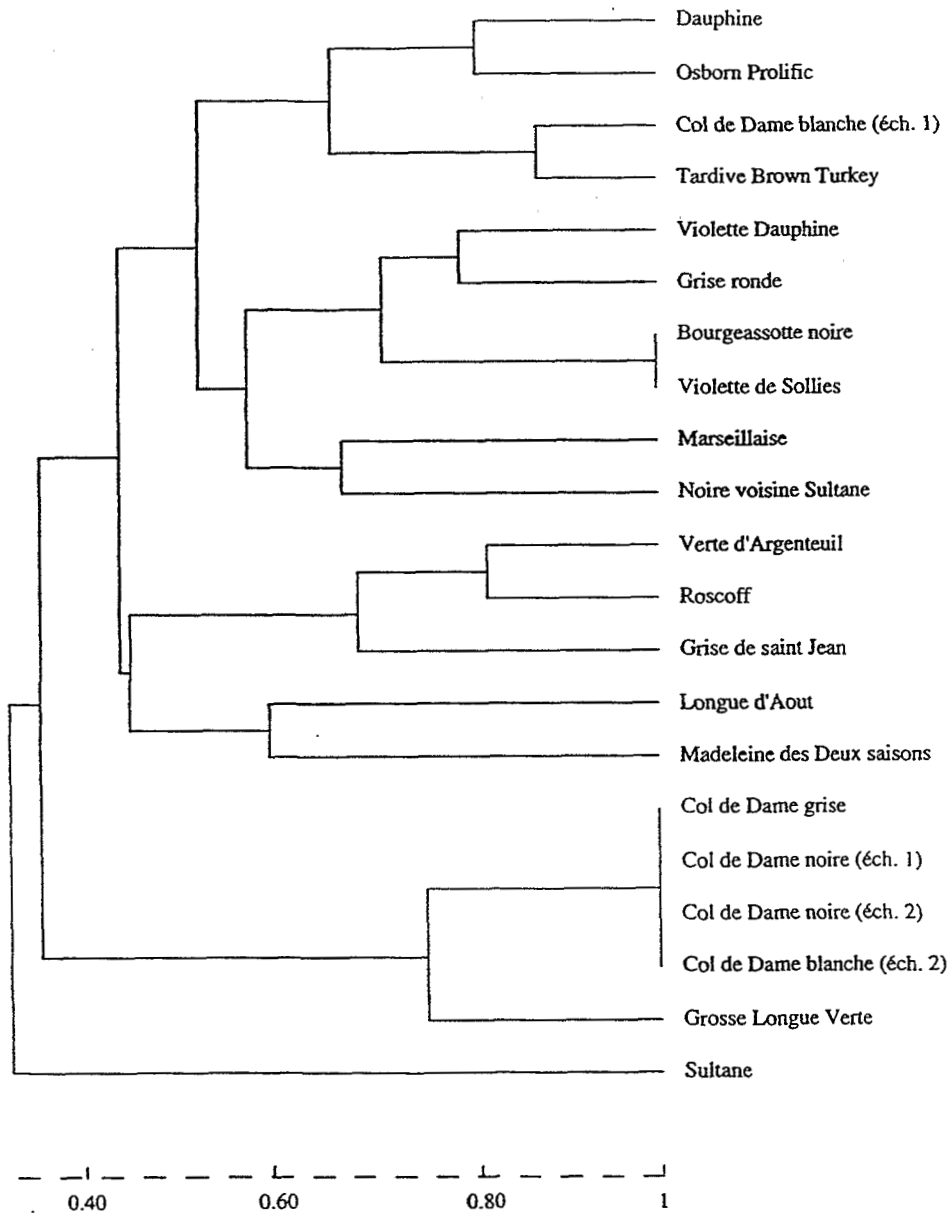


Figure 4. Dendrogramme construit par UPGMA à partir de l'indice de similarité de Nei et Li [27].

Conclusion

Cette étude montre que l'application des marqueurs RAPD pour l'identification de variétés au sein d'une collection est possible. Elle a permis de caractériser les marqueurs qui peuvent servir pour identifier l'ensemble des échantillons présents dans une collection comme celle du conservatoire botanique de Porquerolles. En effet, les 19 marqueurs déterminés permettent d'obtenir, sous l'hypothèse d'indépendance, 524 288 (2¹⁹) profils multilocus différents. Un ensemble de 500 échantillons devrait facilement être identifié. Cette technique offre, en outre, l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et permet d'éviter l'emploi de la radioactivité et d'obtenir rapidement des résultats [28]. Cependant, elle présente l'inconvénient d'être très sensible au moindre changement dans les conditions de PCR. Bien que travaillant avec les mêmes conditions optimales, il arrive parfois que la PCR soit médiocre ou absente, ce qui montre que certains paramètres ne sont pas encore maîtrisés [44]. En vue d'obtenir des résultats reproductibles, il est donc primordial de faire une sélection intense sur les amorces et sur les produits d'amplification.

Cette étude montre que ces génotypes ont une base génétique relativement large sans différenciation en groupes distincts. La variabilité non structurée obtenue est due probablement à un brassage de gènes, mais le faible nombre d'échantillons analysés, pour l'essentiel d'origine française, ne permet pas de tester cette hypothèse. Condit [10] dénombre un peu plus de 600 variétés de figuier provenant de différents pays méditerranéens. Il serait donc intéressant d'élargir l'étude à un plus grand nombre de variétés issues de régions différentes et de comparer les résultats obtenus à d'autres études sur la variabilité génétique des populations naturelles de *Ficus carica*. Cependant, les marqueurs RAPD présentent l'inconvénient d'être dominants car la présence d'un fragment d'ADN amplifié ne permet pas de distinguer un hétérozygote d'un homozygote [7, 15]. Dans ces conditions, les études de génétique des populations, qui sont importantes pour comprendre les flux de gènes au sein des populations, sont difficilement réalisables. Néanmoins, des premiers travaux utilisant les marqueurs RAPD pour l'étude de la différenciation génétique entre populations naturelles montrent l'intérêt de ces marqueurs dans ce type d'études [8, 17, 26, 34]. La comparaison de la diversité génétique entre les génotypes cultivés et les populations naturelles conduit à l'évaluation des ressources génétiques de l'espèce. Ces connaissances permettront de savoir s'il faut élargir le pool génétique des collections, et d'établir une stratégie d'échantillonnage dans les populations naturelles. Une étude utilisant à la fois les marqueurs RAPD et les alloenzymes permettrait de mieux comprendre les relations génétiques entre plantes cultivées et sauvages de *Ficus carica*.

Remerciements : ce travail a été principalement réalisé au Laboratoire des Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales, ORSTOM, Montpellier ; que le Pr A. Charrier, M. S. Hamon et M. A. Ghesquière soient remerciés pour leur accueil. Les auteurs tiennent à remercier les trois fournisseurs des échantillons de figuier (P. Baud, P. Lienas, J. P. Roger). Ils remercient également G. Laurent pour la mise en culture sous serre du matériel végétal, M. Ch. Gavalda et Ph. Marmey pour l'aide technique qu'ils ont apportée aux analyses. Ce travail a été financé par le contrat INRA-CEE, n° D.G. VI-CT 91105.

Références

1. Arnold ML, Buckner CM, Robinson JJ (1991). Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 1398-1402.
2. Atkinson MD, Withers LA, Simpson MJA (1986). Characterisation of cacao germplasm using isoenzyme markers. *Euphytica* 35 : 741-750.
3. Bailey DC (1983). Isozymic variation and plant breeders' rights. In : Tanksley SD, Orton TJ, eds. *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A. Elsevier, Amsterdam : 425-441.
4. Beckmann JS, Soller M (1983). Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement : methodologies, mapping and cost. *Theor Appl Genet* 67 : 33-43.
5. Benzecri JP (1973). L'analyse des données. *La taxonomie*, tome 1. Paris, Dunod, 616 p.
6. Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary primers. *Bio/Technology* 9 : 553-557.
7. Carlson JE, Tulsieram LK, Glaubitz JC, Luk VWK, Kauffeldt C, Rutledge R (1991). Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor Appl Genet* 83 : 194-200.
8. Chalmers KJ, Waugh R, Sprent JJ, Simons AJ, Powell W (1992). Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69 : 465-472.
9. Condit IJ (1950). Figs characters as affected by climate. *Am Soc Hort Sci Proc* 44 : 211-214.
10. Condit IJ (1955). Figs varieties : a monograph. *Hilgardia*, Berkeley 23 : 323-538.
11. Dallas JF (1988). Detection of DNA « fingerprints » of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite probe. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 6831-6835.
12. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA preparation. Version II. *Plant Mol Biol Rep* 4 : 19-21.
13. Dweikat I, Mackenzie S, Levy M, Ohm H (1993). Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor Appl Genet* 85 : 497-505.
14. Felsenstein J (1987). Phylip, ver. 3.0 (computer software and manual). Dept. genetics. University of Washington, Seattle, W.A. 98195, USA.
15. Hadrys H, Balick M, Schierwater B (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1 : 55-63.
16. Hu J, Quiros CF (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep* 10 : 505-511.
17. Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.). *Theor Appl Genet* 86 : 927-934.
18. Hunt GJ, Page RE Jr (1992). Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theor Appl Genet* 85 : 15-20.
19. Kazan K, Manners JM, Cameron DF (1993). Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* 85 : 882-888.
20. Kjellberg F, Gouyon PH, Ibrahim M, Raymond M, Valdeyron G (1987). The stability of the symbiosis between dioecious figs and their pollinators : a study of *Ficus carica* L. and *Blattophaga psenes* L. *Evolution* 41 : 693-704.
21. Klein-Lankhorst RM, Vermunt A, Weide R, Liharska T, Zabel P (1991). Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor Appl Genet* 83 : 1549-1551.
22. Koller B, Lehmann A, McDermott JM, Gessler C (1993). Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 85 : 901-904.
23. Kresovich S, Williams JGK, McFerson JR, Routman EJ, Schaal BA (1992). Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor Appl Genet* 85 : 190-196.

24. Lashermes Ph, Cros J, Marmey Ph, Charrier A (1993). Use of random amplified polymorphic DNA markers to analyse genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Crop Evol Genet Res* 40 : 91-99.
25. Marmey Ph, Beeching JR, Hamon S, Charrier A (soumis). Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of african cassava *Manihot esculenta* Crantz. *Crop Evol Genet Res*.
26. Mosseler A, Egger KN, Hughes GA (1992). Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Can J For Res* 22 : 1332-1337.
27. Nei M, Li WH (1979). Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 : 5267-5273.
28. Newbury HJ, Ford-Lloyd BV (1993). The use of RAPD for assessing variation in plants. *Pl Grow Reg* 12 : 43-51.
29. Nybom H, Hall HK (1991). Minisatellite DNA « fingerprints » can distinguish *Rubus* cultivars and estimate their degree of relatedness. *Euphytica* 53 : 107-114.
30. Ouazzani N, Lumaret R, Villemur P, Di Giusto F (1993). Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europea* L.). *J Heredity* 84 : 34-42.
31. Reiter RS, Williams JGK, Feldmann K, Rafalski JA, Tingey SV, Scolnik PA (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 1477-1481.
32. Valdeyron G, Valizadeh M (1976). L'identification variétale du figuier, *Ficus carica* L. par l'étude du polymorphisme enzymatique par électrophorèse. *CR Acad Agri* 62, 3 : 170-175.
33. Valizadeh M, Rivals P, Valdeyron G (1977). Utilisation du polymorphisme protéique pour l'étude des variétés de figuier (*Ficus carica* L.). *CR Acad Agri* 63, 10 : 647.
34. Van Heusden AW, Bachmann K (1992). Genotype relationships in *Microseris elegans* (Asteraceae, Lactuceae) revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). *Pl Syst Evol* 179 : 221-233.
35. Weeden NF, Lamb RC (1985). Identification of apple cultivars by isoenzyme phenotypes. *J Am Soc Hortic Sci* 110 : 509-515.
36. Weising K, Ramser J, Kaemmer D, Kahl G, Epplen T (1991). In : Burke T, Dolf J, Jeffreys AJ, Wolff R, eds. *DNA fingerprinting : approaches and applications*.
37. Welsh J, McClelland M (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18 : 7213-7218.
38. Welsh J, Honeycutt RJ, McClelland M, Sobral BWS (1991). Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor Appl Genet* 82 : 473-476.
39. Wilde J, Waugh R, Powell W (1992). Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* 83 : 871-877.
40. Wilkie SE, Isaac PG, Slater RJ (1993). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor Appl Genet* 86 : 497-504.
41. Williams JGK, Kubelik AR, Kenneth JL, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 : 22, 6531.
42. Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol* 51 : 704-740.
43. Wolff K, Peters-Van Rijn J (1993). Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity* 71 : 335-341.
44. Wolff K, Schoen ED, Peters-Van Rijn J (1993). Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum. *Theor Appl Genet* 86 : 1033-1037.
45. Yang X, Quiros C (1993). Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 86 : 205-212.