

**Flux de gènes entre formes domestiquée et sauvage du mil
Pennisetum glaucum (L.) R. Br. en conditions expérimentales au Sahel**

J.-F. Renno, T. Winkel, F. Bonnefous, G. Bezançon

ORSTOM, BP 11416, Niamey, Niger

RÉSUMÉ

En conditions naturelles, les formes sauvages et cultivées du mil échangent des gènes depuis des millénaires et restent cependant fortement différenciées par leur morphologie. En conditions expérimentales au Sahel, les échanges de gènes entre mil sauvage et mil cultivé ont été mesurés à l'aide de marqueurs enzymatiques et mis en relation avec la phénologie des plantes. Les flux sont fortement dissymétriques. Sur la totalité des cycles, 8% d'hybrides sont engendrés par l'échantillon de mil sauvage et cinq fois plus par l'échantillon de mil cultivé. La proportion d'hybrides produits par le mil sauvage dépend des variations d'intensité du nuage pollinique émis par le mil cultivé, alors que le nuage pollinique émis par le mil sauvage n'apparaît jamais limitant pour l'hybridation. Le taux de germination des graines produites par les plantes de phénotype cultivé à différents moments de leur cycle est corrélé négativement à la fréquence des hybrides formés à ces différents moments. La vitesse de germination des graines issues des plantes de phénotype cultivé ou de phénotype intermédiaire entre cultivé et sauvage (chibra) est corrélée négativement à la fréquence des hybrides. Les effets de l'équilibre entre brassages génétiques, isolements et barrières à la reproduction, pressions de sélection anthropiques et naturelles, sont discutés pour expliquer l'évolution et le maintien du polymorphisme de *Pennisetum glaucum*.

Communication présentée à la réunion internationale
"Managing Plant Genetic Resources in the African Savannah"
Bamako, Mali, février 1997



Ex: : cote :
documentaire ORSTOM

Fonds Documentaire ORSTOM 1
Cote: *A* M152* Ex: *1*

INTRODUCTION

Le mil, *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., espèce annuelle, diploïde ($2n=2x=14$), sexuée, hermaphrodite est préférentiellement allogame du fait d'une protogynie marquée et d'une pollinisation anémophile. Ces caractéristiques favorisent les échanges géniques entre individus d'une même population, mais aussi entre plantes sauvages et cultivées en sympatrie. En conséquence, les champs cultivés aussi bien que les populations sauvages peuvent être envahis par des formes intermédiaires fertiles, appelées « chibra » au Niger.

Les plus anciens vestiges archéologiques observés attestant de la culture du mil en contact avec la forme sauvage remonteraient à environ 3000 ans BP (Amblard et Pernès, 1989). Depuis le néolithique, mil domestiqué et mil sauvage évolueraient donc en sympatrie dans une large partie de la région sahélienne tout en maintenant leur intégrité. Pour expliquer ce phénomène deux causes principales limitant les échanges géniques peuvent être invoquées : les isolements à la reproduction et les barrières à la reproduction. L'isolement à la reproduction est spatial lorsque les aires de distribution des deux formes de mil sont disjointes. Il est temporel quand, en sympatrie avec le mil cultivé, le mil sauvage se trouve en situation d'endogamie totale pendant une partie de son cycle en raison de sa floraison beaucoup plus étalée que celle du mil cultivé (Renno et Winkel, 1996). Lorsqu'il n'y a plus d'isolement à la reproduction, les échanges géniques deviennent possibles, mais des barrières à la reproduction vont intervenir et contribuer à les freiner. D'abord entrent en jeu des barrières prézygotiques telles que la compétition pollinique, à l'avantage de l'autopollen (Sarr et al., 1988; Robert et al., 1991). Puis interviennent des barrières postzygotiques qui s'expriment par la baisse de viabilité des graines hybrides (Amoukou & Marchais, 1993). Si, malgré les freins aux échanges de gènes, le brassage génétique s'opère, le syndrome de domestication pourrait parfois réapparaître au cours des générations au gré de recombinaisons génétiques, car il est déterminé par des allèles récessifs, peu nombreux et étroitement liés sur le même chromosome (Pernès et al., 1984). Par ailleurs, l'espèce *P. glaucum* serait soumise à des pressions de sélection différentielles, l'Homme et la Nature imposant le maintien du mil cultivé et du mil sauvage.

En dépit des isolements et des barrières à la reproduction, quelle est la proportion de gènes pouvant être échangés entre mil sauvage et mil cultivé au cours d'une génération ? Ces flux de gènes sont-ils symétriques ? Comment et par quoi sont-ils structurés ? Quelle est la proportion d'hybrides susceptible de contribuer aux générations suivantes ? Des réponses à ces questions dépend la compréhension de l'équilibre mis en place au cours de l'évolution entre les différentes forces qui maintiennent le polymorphisme de l'espèce *P. glaucum*. L'étude présentée ici a pour objectifs spécifiques de quantifier les flux de gènes entre mil sauvage et mil cultivé en relation avec la floraison des plantes, et d'évaluer leurs conséquences sur le devenir immédiat de la descendance des deux formes de mil.

MATERIEL ET METHODES

PRINCIPE D'ETUDE

Les échantillons d'origine utilisés dans cet essai étaient constitués de semences collectées dans des champs de mil cultivé et dans des populations de mil sauvage vivant en sympatrie. L'utilisation de semences prélevées dans l'agrosystème, et non pas issues de lignées fixées, a permis d'accéder à la variabilité réelle de l'espèce, telle qu'elle peut se rencontrer dans le milieu naturel. A la saison de la culture du mil, les plantules issues des semences récoltées *in situ*, ont été différenciées en deux catégories d'homozygotes par deux allozymes correspondant chacune à un allèle du même gène servant ainsi de marqueur. Ces plantules marquées ont ensuite été repiquées dans une parcelle isolée des cultures selon un plan en damier afin qu'elles aient chacune un voisinage similaire (figure 1). Dans la descendance des plantes de la parcelle, les individus hétérozygotes au gène servant de marqueur étaient nécessairement le fruit d'une hybridation entre mil sauvage et mil cultivé. La fréquence des hybrides produits par chacun des échantillons de mil a rendu compte du flux de gènes fécondant émis par l'autre échantillon.

DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Les conditions expérimentales de cette étude sont présentées en détail par Renno et al. (sous presse). Les semences utilisées provenaient des environs de la ville de Tanout (Niger), région où la variété locale Ankoutess est très majoritaire. Le gène utilisé comme marqueur permet la synthèse de l'enzyme phosphoglucomutase (PGM, E.C. 5.4.2.2.). Il s'exprime sous deux formes alléliques rencontrées dans les deux échantillons. Pour constituer l'échantillon de mil cultivé, seules les plantes homozygotes au locus *Pgm* (100, 100) ont été repiquées dans la parcelle, tandis que pour constituer celui de mil sauvage seules les plantes *Pgm* (104, 104) ont été utilisées. Les descendants des deux échantillons, lorsqu'ils étaient le fruit d'une hybridation entre mil sauvage et mil cultivé, étaient hétérozygotes *Pgm* (100, 104), et leur proportion rendait compte des flux de gènes échangés.

La parcelle expérimentale était éloignée des champs de mil et mise en place avec un mois de retard sur les cultures de la région, ceci afin de limiter les risques de pollution par du pollen extérieur. Elle comprenait 196 plantes (1 plante / m²). La bordure extérieure (52 plantes) a servi de protection. Sa floraison a toutefois été suivie puisqu'elle participait au nuage pollinique. A l'intérieur de cette bordure, toutes les plantes ont été utilisées pour l'analyse des flux de gènes, soit 72 plantes issues de l'échantillon de mil cultivé et 72 autres issues de l'échantillon de mil sauvage. Dans chacun des deux groupes, des formes intermédiaires (chibra) sont apparues, situation habituelle dans le cas de lignées non fixées. Trois phénotypes étaient donc en présence dans la parcelle : le phénotype sauvage, le phénotype cultivé Ankoutess et le phénotype intermédiaire chibra, ce dernier étant toutefois minoritaire. Les plantes se distribuaient ainsi :

- 61 plantes de phénotype cultivé, constituant le groupe CLT (1 plante de ce groupe est restée stérile) ;
- 11 de phénotype chibra dans l'échantillon issu des semences de mil cultivé, constituant le groupe CHB ;
- 68 de phénotype sauvage, constituant le groupe SVG ;
- 4 de phénotype chibra dans l'échantillon issu des semences de populations sauvages, constituant un groupe trop limité pour être analysé.

OBSERVATIONS

Phénologie de la floraison

La date de floraison femelle de chaque épi a été notée sur l'ensemble des 196 plantes, tandis que la floraison mâle a été suivie sur un sous-échantillon de 30 plantes de chaque origine afin d'estimer le décalage journalier moyen entre la floraison femelle et la floraison mâle d'un épi (figure 1).

Viabilité et vitesse de germination des graines

On a considéré que toutes les graines d'un épi étaient produites le jour où la floraison femelle était observée sur cet épi. Il s'agit là d'une approximation car en réalité un épi est au stade femelle pendant 3 à 4 jours. Des lots de 150 graines produites chaque jour du cycle de floraison pour chacun des phénotypes (CLT, SVG ou CHB) ont été mis à germer en boîtes de Pétri à 40°C. La germination s'est échelonnée sur 48 heures et la proportion de graines germées a été notée en distinguant quatre périodes : 0-8h, 8-16h, 16-24h et 24-48h après la mise en germination.

Proportion d'hybrides formées au cours du cycle de floraison

Au fur et à mesure de leur germination, les plantules ont été analysées par électrophorèse enzymatique. La distribution des hybrides *Pgm* (100, 104) formés au cours du cycle de floraison a ainsi pu être obtenue pour chacun des phénotypes CLT, SVG et CHB. Les flux de gènes globaux (sur la totalité des cycles), ont été évalués par le calcul de la moyenne des flux journaliers pondérés par la production journalière de graines. De plus, pour chacun des lots analysés la fréquence des hybrides germés a été suivie sur les 48 heures de germination en distinguant les périodes : 0-8h, 8-16h, 16-24h et 24-48h.

RESULTATS

Afin de décrire la phénologie de la floraison, tous les épis de la parcelle (22000 épis au total) ont été observés puis battus pour en prélever les graines. Pour la quantification des flux de gènes, 7942 plantules ont été analysées : 2597 produites par le CLT, 1503 par le CHB et 3842 par le SVG.

PHENOLOGIE DE LA FLORAISON

La floraison femelle précède de 4 jours en moyenne la floraison mâle. Le SVG commence à fleurir 47 jours après le semis (JAS) et termine à 144 JAS, tandis que le CLT fleurit entre 62 et 84 JAS. L'étalement de la floraison du CHB est comparable à celui du SVG. Les productions d'épis et de graines par plante sont très différentes selon les phénotypes (tableau 1). Considérant que les nombres de graines et de fleurs fertiles produites par une plante sont étroitement corrélés, il apparaît que la production moyenne de fleurs d'une plante sauvage englobe totalement celle d'une plante cultivée (figure 2). Dans un premier temps, le nuage pollinique de l'échantillon de mil sauvage « noie » la floraison du mil cultivé. Le mil sauvage se trouve ensuite isolé du mil cultivé pour sa reproduction jusqu'à la fin de son cycle, de 85 à 144 JAS. Le CHB a un comportement phénologique proche du SVG, mais la quantité de fleurs produites dans la parcelle est très faible en raison de la faible proportion de plantes de type chibra.

FLUX DE GENES ET CONSEQUENCES SUR LA GERMINATION DES DESCENDANTS

Les flux de gènes sont fortement dissymétriques, avec plus de 40% d'hybrides produits dans la descendance de CLT ou celle de CHB, contre seulement 11% dans celle de SVG lors de la floraison de CLT (tableau 1). Sur la totalité des cycles, 8% d'hybrides sont engendrés par l'échantillon de mil sauvage, soit cinq fois moins que par celui de mil cultivé. La distribution journalière du pourcentage d'hybrides produits par le SVG est significativement corrélée à la floraison de CLT ($r = 0.61$, $P < 0.01$), alors que la distribution journalière d'hybrides produits par CLT ou CHB est indépendante des variations de floraison de SVG (figure 3). Le CHB participe peu à la fécondation du SVG, en raison probablement du faible nombre de plantes impliquées, puisque après la floraison de CLT seulement 0.1% d'hybrides sont produits par le SVG.

La proportion des graines viables (graines germées) produites par le CLT un jour donné est inversement proportionnelle au pourcentage d'hybrides formés ce jour ($r = -0.53$, $P < 0.01$), ce qui n'est pas le cas pour le SVG et le CHB. Toutes dates de fécondation confondues, le pourcentage d'hybrides germés augmente régulièrement avec la durée de mise en germination : il passe de 36 à 85% pour le CLT et de 32 à 78% pour le CHB entre les périodes 0-8h et 24-48h (figure 4). Ce phénomène n'a pas été observé pour le SVG.

DISCUSSION

Dans les régions où mil cultivé et mil sauvage sont en sympatrie, la fréquence des phénotypes intermédiaires (chibra) dans les champs cultivés varierait entre 5 et 30% (Rey-Herme, 1992), alors que dans les populations de mil sauvage au Sénégal et au Niger cette fréquence a été estimée à 31 et 19% respectivement (Marchais et Tostain, 1992). Ces observations attestent de l'importance de l'effet des échanges géniques dans la production de formes déviantes en conditions naturelles. Elles ne peuvent toutefois pas rendre compte de la forte dissymétrie de ces échanges, car elles amalgament toutes les formes intermédiaires, quel que soit leur statut génétique (F1, F2, croisements en retour...). Dans l'étude expérimentale présentée ici, les flux de gènes entre mil sauvage et mil cultivé ont pu être quantifiés par la production d'hybrides de première génération (Renno et al., sous presse). La totalité de la période de floraison du mil cultivé s'inscrit dans celle du mil sauvage et plus de la moitié de la période de reproduction de ce dernier se déroule en dehors de la floraison du mil cultivé, donc en total isolement reproductif. Dans les conditions expérimentales présentées ici, si l'on considère les flux de gènes et la production de graines qui en résulte, la probabilité pour une plante d'engendrer un individu de même phénotype qu'elle est 14 fois plus élevée pour une plante sauvage que pour une plante cultivée. Le mil sauvage apparaît donc nettement plus efficace que le mil cultivé pour maintenir son

intégrité phénotypique. De plus, son nuage pollinique n'apparaît jamais limitant pour l'hybridation puisque la production d'hybrides par l'échantillon de mil cultivé est toujours proche du maximum. La disposition des plantes dans la parcelle a été conditionnée par la nécessité de quantifier les flux de gène en situation d'équiprobabilité de fécondation, toutes choses égales par ailleurs. Une telle disposition n'est évidemment jamais observée dans la nature où les plantes d'un même phénotype sont regroupées en champs cultivés ou en populations spontanées. Au contact d'un champ de mil et d'une population de mil sauvage, les échanges seraient donc dissymétriques, et diminueraient en s'éloignant de la zone de contact, suivant la dispersion des nuages polliniques (Burton, 1974).

L'influence des barrières prézygotiques sur les échanges de gènes, quoique réelle, n'a pu être mise en évidence dans le cadre de cette expérimentation. En revanche, l'effet des barrières postzygotiques est perceptible à travers la perte de viabilité des hybrides produits par le mil cultivé. Ceci a déjà été signalé dans le cas de croisements contrôlés entre mil cultivé et mil sauvage (Amoukou & Marchais, 1993). A ce phénomène s'ajoute le retard de germination des plantes hybrides produites par le phénotype cultivé ou le phénotype chibra. En milieu paysan et en situation de compétition avec le mil chibra, le mil cultivé serait donc avantagé une première fois par une germination plus rapide dans le poquet puis, au moment du démariage, lorsque le paysan choisi d'éliminer les plantes les moins vigoureuses (Couturon et al, 1997). Le maintien du mil cultivé dépend de pressions de sélections anthropiques. Toutefois l'introgression de son génome par des gènes de populations sauvages évoluant sous les seules contraintes de la sélection naturelle, si elle favorise l'apparition de chibras peu productifs, pourrait aussi entretenir sa capacité d'adaptation aux fluctuations écologiques (notamment climatiques) caractéristiques de la zone sahélienne.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr. R.D. Stern de l'ICRISAT pour son appui en statistique, ainsi que les observateurs de l'ORSTOM et de l'IRI (Université de Niamey) qui ont participé à la collecte des données. Cette étude a été financée par l'ORSTOM et le programme CEE n° TS3-CT94-0280.

BIBLIOGRAPHIE

- Amblard, S. and Pernès, J. 1989. The identification of cultivated pearl millet (*Pennisetum*) amongst plant on pottery from Oued Chebbi (Dhar Oualata, Mauritania). *Afr. Archeol. Rev.* 7: 117-126.
- Amoukou, A.I. and Marchais, L. 1993. Evidence of a partial reproductive barrier between wild and cultivated pearl millets (*Pennisetum glaucum*). *Euphytica* 67: 19-26.
- Burton, G.W. 1974. Factors affecting pollen movement and natural crossing in pearl millet. *Crop Sci.* 14: 802-805.
- Couturon, E., Bezançon, G. and Renno, J.-F. 1997. Influence des pratiques culturales sur l'évolution de la fréquence des hybrides « chibra » dans un champs de mil, *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., au Sahel. *Managing Plant Genetic Resources in the African Savannah, International meeting, Bamako (Mali)*.
- Marchais, L. and Tostain, S. 1992. Bimodal phenotypic structure of two wild pearl millet samples collected in agricultural area. *Biodiv. Conserv.* 1: 170-178.
- Pernès, J., Combes, D., and Leblanc, J.M. 1984. Le Mil. In *Gestion des ressources génétiques des plantes*, tome 1: monographies. Edited by J. Pernès. ACCT, Paris. pp. 159-197.
- Renno, J.F. and Winkel, T. 1996. Phenology and reproductive effort of cultivated and wild forms of *Pennisetum glaucum* (L.) R.Br. under experimental conditions in the Sahel: implications for the maintenance of polymorphism in the species. *Can. J. Bot.* 74: 959-964.
- Renno, J.F., Winkel, T., Bonnefous, F. and Bezançon, G. Quantitative study of gene flow between wild and cultivated *Pennisetum glaucum*: relation to the phenology of flowering and implications for the germination of the progeny. *Can. J. Bot.* (sous presse).
- Rey-Herme, C. 1982. Les relations génétiques entres formes spontanées et cultivées chez le mil (*Pennisetum* sp.). Thèse de 3^{me} Cycle, Université Paris XI, Orsay, France.
- Robert, T., Lespinasse, R., Pernès, J. and Sarr, A. 1991. Gametophytic competition as influencing gene flow between wild and cultivated forms of pearl millet (*Pennisetum typhoides*). *Genome* 34: 195-200.
- Sarr, A., Sandmeier, M., and Pernès, J. 1988. Gametophytic competition in pearl millet *Pennisetum typhoides* (Stapf and Hubb.). *Genome* 30: 924-929.

LÉGENDES DES FIGURES

Figure 1. Plan de la parcelle expérimentale. C = phénotype cultivé, C' = phénotype chibra du mil cultivé, S = phénotype sauvage, S' = phénotype chibra du mil sauvage.

Les petites lettres représentent les plantes de bordure, les grandes lettres les plantes utilisées pour mesurer les flux de gènes et la production d'épis et de graines. Les lettres en caractères gras représentent les plantes observées au stade mâle.

Figure 2. Variations du nombre moyen de fleurs par plante estimé pour le mil cultivé (CLT), sauvage (SVG) et chibra (CHB) durant le cycle de floraison.

Figure 3. Variations du pourcentage d'hybrides engendrés par le mil cultivé (CLT), sauvage (SVG) et chibra (CHB) durant le cycle de floraison. Les barres verticales représentent les erreurs standards.

Figure 4. Variations du pourcentage d'hybrides germés en 48 heures dans la descendance du mil cultivé (CLT), sauvage (SVG) et chibra (CHB), pour les quatre périodes 0-8h, 8-16h, 16-24h et 24-48h. Les barres verticales représentent les erreurs standards.

Tableau 1. Nombres moyens d'épis et de graines produits par une plante sur la totalité de son cycle ; taux de germination et pourcentage d'hybrides.

	Epis	Graines	Taux de germination*	Pourcentage d'hybrides*
Cultivé				
moyenne	2.8	7861	80.1	50.2
<i>N</i>	60	60	22	22
CV	50	55	16	21
ES	0.2	559	2.9	2.3
Sauvage				
moyenne	319	56359	91.8	11.3
<i>N</i>	68	68	24	24
CV	53	49	6	68
ES	20	3365	1.2	1.6
Chibra				
moyenne	21.1	11134	71.2	41.9
<i>N</i>	11	11	15	15
CV	58	42	27	34
ES	3.7	1420	5.0	3.7

Note: *N*, effectif ; CV, coefficient de variation (%) ; ES, erreur standard;

* pendant la période de floraison de la forme fécondante.





