

CHAPITRE IV

QUELQUES ILLUSTRATIONS DE L'UTILISATION DES MARQUEURS ENZYMATIQUES CHEZ LE MIL

M. SANDMEIER, S. PILATE-ANDRÉ et E. MÉTIVIER
Laboratoire d'Evolution et Systématique Végétales, Bâtiment 362
Université de Paris Sud ; 91405 Orsay Cedex.

La mise au point de méthodes de séparation et de caractérisation des allozymes chez le mil a permis de mettre en évidence 60 loci différents, dont les 4/5 sont polymorphes. Cet outil a été utilisé dans divers domaines :

- **La biologie reproductive du mil** : analyse des compétitions polliniques, overlapping, distorsion de ségrégation ou détermination du taux d'autofécondation ;
- **La gestion des ressources génétiques** : variations spatio-temporelles du pool pollinique en conditions naturelles, flux de gènes entre les compartiments sauvages et cultivés, structuration de la variabilité des populations naturelles et cultivées ;
- **L'analyse génétique** : la domestication, considérée comme un modèle dans l'évolution et la cartographie du génome.

Après une introduction rappelant les avantages et les inconvénients de la méthode, trois exemples sont développés : structure génétique des populations de mils africains, variations spatio-temporelles du nuage pollinique et détermination du taux de selfing.

I - INTRODUCTION

La précision d'une mesure dépend de la fiabilité de l'outil utilisé. Dans le cas de la variabilité génétique, le généticien des populations doit avoir à sa disposition des outils lui permettant de caractériser la variabilité génétique dont la source se trouve au niveau des gènes. Pendant longtemps, elle a été mesurée à partir de caractères morphologiques dont le déterminisme génétique est souvent polygénique, de plus, l'expression de ces gènes est souvent modifiée par les conditions environnementales dans lesquelles poussent les plantes. Depuis quelques années, on a à notre disposition un certain nombre d'outils complémentaires, qui permettent d'affiner la mesure de la diversité génétique. On peut citer les 5 catégories suivantes : les allozymes, les protéines, révélées souvent en conditions dénaturantes par électrophorèse bi-dimensionnelle, des marqueurs chimiques dont le déterminisme génétique est simple, comme par exemple les terpènes, des marqueurs chromosomiques : les différents banding ou l'hybridation *in situ*, des marqueurs révélés directement au niveau de l'ADN, permettant de révéler la variabilité de l'ensemble du génome, (les RFLP par exemple).

II - RESULTATS

A - Quelques généralités sur les allozymes

Découverts en 1957 par Hunter et Markert, les allozymes possèdent les avantages suivants :

- ils sont sous la dépendance de 1 ou 2 loci au maximum ; un petit nombre d'étapes est nécessaire pour traduire et transcrire le code génétique en protéines, ce qui évite des avatars post traductionnels ;
- beaucoup d'entre eux possèdent des allèles codominants permettant d'apprécier l'hétérozygotie ou de tester la panmixie des populations ;
- leur expression dépend peu des conditions environnementales de croissance des plantes ;
- leur mise en évidence est simple et peu onéreuse.

Ils présentent quelques inconvénients dont les principaux sont les suivants :

- on ne peut pas mettre en évidence la totalité de la variabilité génétique du fait de la dégénérescence du code génétique ou de l'absence de séparation des isozymes dont la charge électrique est identique ;
- on ne mesure la variabilité génétique que sur la fraction du génome codant pour des

nuages polliniques (Métivier, 1986 ; Cherkaoui, 1986 ; Cherid, 1986) ou la détermination des taux d'autofécondation chez le mil ; on développera plus particulièrement ces trois derniers points.

Liste des marqueurs enzymatiques chez le Mil

Enzyme	Locus	Allèle	Enzyme	Locus	Allèle	
Ak	A	0,1	POX CAT	-K	0*,1	
	B	0,1		-J	0,1*	
	C	1*		-I	0,1*	
ADH	A	1,2*,3		-H	0*,1	
	B	1,2*,3		-G	0,1	
CAT	A	1,2		-F	1*	
				-E	0*,1	
DIA	A	1,2		-D	0,1	
	B	1,2,3		-C	0,1	
	C	1		-B	0,1	
END	A	1	POX AN	-A	0,1	
	EST	A		0*,1	A	0*,1
		B		0,1*	B	0,1*
		C		0,1*	C	0*,1
D		0*,1		D	0*,1	
E		1,2,3,4,5,6		E	0*,1	
GOT	A	1,2*,3		F	1*	
	B	1,2*		G	0*,1	
	C	1*	H	0,1*		
HEXO	A	1,2	PHOS	A	0*,1	
	B	1*		B	1*	
ICD	A	1,2*,3		C	1*	
				D	0*,1	
				E	0*,1	
LAP	A	1,2,3		F	0*,1	
MDH	-A	1,2	6-PGD	A	1,2*,3	
	A	1,2*3		B	1,2*	
	B	1,2,3*,4,5		C	1*	
	C	1,2*				
	D	1,2*,3	PGI	A	1,2*,3,4*,5	
mmm	0*,1					
			PGM	A	1,2*,3,4*	
			SOD	A	1*	
				B	1,2	
				C	1*	

C - Structure génétique des populations de mil

Ces résultats sont tirés des travaux réalisés par une vingtaine d'auteurs dont les principaux furent : Pilate-André, Leblanc, Sandmeier, Tazi et Trigui. Ils complètent les analyses faites sur le même sujet, mais sur des populations différentes par Tostain *et al.* (1987 et 1989).

Les résultats montrés dans la figure 1 (dendrogramme construit à partir de la distance de Nei) ont été obtenus à partir de l'analyse de 15 loci différents sur 63 populations. L'analyse de ces résultats permet de formuler les remarques suivantes :

1) La diversité génétique est structurée en trois zones géographiques : l'Afrique de l'Ouest, l'Afrique Centrale et l'Afrique de l'Est ; les deux premières zones présentent un certain nombre d'interpénétrations alors que le groupe de l'Afrique de l'Est est bien différencié.

2) Les formes sauvages, issues pour leur quasi totalité d'Afrique de l'Ouest ne forment pas une entité structurée : elles se retrouvent au sein des populations de l'Afrique de l'Ouest. Elles ont été comparées à des cultivars récoltés dans les mêmes villages ; on peut voir que ces couples sauvage-cultivé sont très proches génétiquement, à l'exception de l'un d'eux originaire du Cameroun.

3) La variabilité intrapopulation représente environ 75 % de la variabilité totale, la variabilité entre les populations est donc faible (Pilate-André 1992).

La répartition des 3 allèles du locus ADH A chez le mil présente un cline est-ouest et nord-sud attesté par les coefficients de corrélation calculés entre la longitude ou la latitude de récolte des cultivars et la fréquence de chaque allèle (195 populations récoltées dans 21 pays africains) :

Allèle	A1	A2	A3
Latitude	0,102 ns	- 0,585**	0,610**
Longitude	0,219*	-0,578**	0,521**

(ns : Non significatif ; * p comprise entre 0,05 et 0,01 ; ** $p < 0,01$)

La répartition des fréquences alléliques montre que l'allèle A2 est largement majoritaire à l'ouest et au nord de l'Afrique, quand on descend vers le sud, à partir du Mali, on observe une augmentation de la fréquence de l'allèle A1 et une diminution de l'allèle A2.

D - Variations spatio-temporelles du pool pollinique

Lors d'une prospection au Mali, Sandmeier *et al.* (1986), ont récolté à Sandaré, dans un champ sur pieds, 10 chandelles dont l'emplacement a été noté avec précision. Les plantes avaient un phénotype cultivé pour 5 d'entre elles, 3 étaient des chibras et 2 avaient le phénotype sauvage.

Ces épis ont été considérés comme des capteurs de pollen et on a pu ainsi, connaissant le génotype maternel, déterminer la composition allélique du nuage pollinique entourant la chandelle au moment de sa fécondation (Métivier 1986). Pour les 4 locus analysés, on a comparé l'homogénéité des nuages polliniques soit en fonction du compartiment biologique de la plante mère soit de l'emplacement des épis dans la parcelle. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 2, d'où on peut tirer les remarques suivantes : le nuage pollinique entourant les chibras ou les sauvages est homogène pour 3 loci sur les 4 analysés, par contre pour le compartiment cultivé, on observe une très forte hétérogénéité du pool pollinique, cette situation se confirme pour l'ensemble des chandelles. En ce qui concerne les couples ou le trio de plantes ayant poussé côte à côte, on observe également une très forte hétérogénéité du nuage pollinique.

Tableau 2

Hétérogénéité du nuage pollinique dans un champ de mil traditionnel à Sandaré (Mali), d'après Métivier 1986

a) Au sein des compartiments biologiques

Compartiment biologique	Nombre de chandelles	Allozyme			
		CAT	PGI	PGM	EST
sauvage	2	0,1ns	0,4ns	4,4ns	35,1**
cultivé	5	69,0**	44,8**	30,3**	66,2
chibra	3	6,8ns	4,1ns	0,1ns	24,0**
ensemble des chandelles	10	104,5**	57,3**	159,1**	175,2**

On voit donc que dans un champ, ensemençé avec la même population, il se forme des micropopulations différenciées génétiquement, cette différenciation est fonction de l'emplacement de la plante dans le champ et vraisemblablement de sa date de floraison. Ce résultat est important à considérer dans le cadre d'une gestion dynamique des ressources génétiques : des précautions insuffisantes dans l'échantillonnage pouvant amener des modifications dans la composition génétique des populations.

E - Détermination du taux d'autofécondation (AF)

Des plantes tests possédant un allèle particulier au locus ADH A ont été réparties dans une parcelle emblavée par des plantes possédant un autre allèle. Sur les chandelles des plantes tests, on a pu déterminer le taux d'AF en comptant, dans la descendance, le nombre de graines homozygotes pour le locus ADH A (Sandmeier 1993). Notons que la

Tableau 3
Taux d'autofécondation (AF) chez le mil
(d'après Sandmeier 1993)

Plante (1)	% d'AF (2)	Chi ²
43 ₁	21,7	-
51 ₁	6,3	1,56 (ns)
51 ₂	3,1	(2ddl)
51 ₃	3,2	
58 ₁	17,9	3,51 (ns)
58 ₂	19,3	(3ddl)
58 ₃	20,3	
58 ₄	12,5	
146 ₁	10,5	8,26 (**)
146 ₃	2,2	(1ddl)
151 ₁	14,6	0,3 (ns)
151 ₂	18,8	(1ddl)
156 ₁	5,3	3,1 (ns)
156 ₂	12,6	(2ddl)
156 ₃	10,5	
243 ₁	5,5	-
251 ₁	7,3	3,48 (ns)
251 ₂	2,1	(2ddl)
251 ₃	3,3	
258 ₁	13,3	-

(1): Les différents index représentent les différentes chandelles sur les plantes test.

- LE THI (K.), 1990. Génétique du gamétophyte mâle du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb.) : relations entre l'overlapping et l'organisation de la variabilité génétique des plantes haploïdes doublées (HD) issues de culture d'anthères. Thèse, Univ. Paris-Sud.
- MÉTIVIER (E.), 1986. Etude des échanges géniques en conditions naturelles entre mils sauvages et cultivés dans le village de Sandaré (Mali). DEA. Université de Paris.
- PERNÈS (J.) 1985. Evolution des plantes cultivées : l'exemple des céréales. C. R. Acad. Sci., série générale. 2 : 429-447.
- PILATE-ANDRÉ (S.), 1992. Etude de l'organisation de la diversité génétique du complexe des mils pénicillaires (*Pennisetum* ssp.) par les marqueurs enzymatiques et par l'analyse moléculaire de la région Adh. Thèse, université de Paris-Sud.
- REY-HERME (C.) 1982. Les relations génétiques entre les formes spontanées et cultivées chez le mil (*Pennisetum* sp.). Thèse, université de Paris-Sud.
- ROBERT (T.), SARR (A.) et PERNÈS (J.), 1989. Sélections sur la phase haploïde chez le mil (*Pennisetum typhoides* (Burm, Stapf et Hubb.) : effet de la température. 32 : 946-952.
- SANDMEIER (M.), 1993. Selfing rates of Pearl Millet (*Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb.) in natural conditions. Theor. Appl. Genet. (in press).
- SANDMEIER (M.), PILATE-ANDRÉ (S.) et PERNÈS (J.), 1986. Relations génétiques entre les populations de mils sauvages et cultivés : résultats d'une enquête au Mali. J. Agric. Trad. et Bot. Appl. 33 : 69-89.
- SARR (A.) 1987. Analyse génétique de l'organisation reproductive du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb.). Implications pour son amélioration et la gestion des ressources génétiques; Thèse, université de Paris-Sud.
- TOSTAIN (S.), 1985. Mise en évidence d'une liaison génétique entre un gène de nanisme et des marqueurs enzymatiques chez le mil pénicillaire (*Pennisetum glaucum*). 1985. Canad. J. Cytol. 27 : 751-758.
- TOSTAIN (S.) et RIANDEY (M.F.), 1985. Polymorphisme et déterminisme génétique des enzymes du mil pénicillaire (*Pennisetum glaucum*). Etude des malades déshydrogénases. Agronomie. 3 : 227-238.

- TOSTAIN (S.), RIANDEY (M.F.) and MARCHAIS (L), 1987. Enzyme diversity in pearl millet (*Pennisetum glaucum*). 1. West Africa. *Theor. Appl. Genet.* 74 : 188-193.
- TOSTAIN (S.) and MARCHAIS (L.), 1989. Enzyme diversity in pearl millet (*Pennisetum glaucum*). 2. Africa and India. *Theor. Appl. Genet.* 77 : 634-640.
- TRIGUI (N.), SANDMEIER (M.), SALANOUBAT (M.) et PERNÈS (J.), 1986. Utilisation des données enzymatiques et morphologiques pour l'étude des populations et de la domestication des plantes : I Séparation et identification génétique d'isozymes chez le mil (*Pennisetum typhoides* Durm., Steud. et Hubb.). *Agrochimie* 6 : 770-788.

Distance de Nei

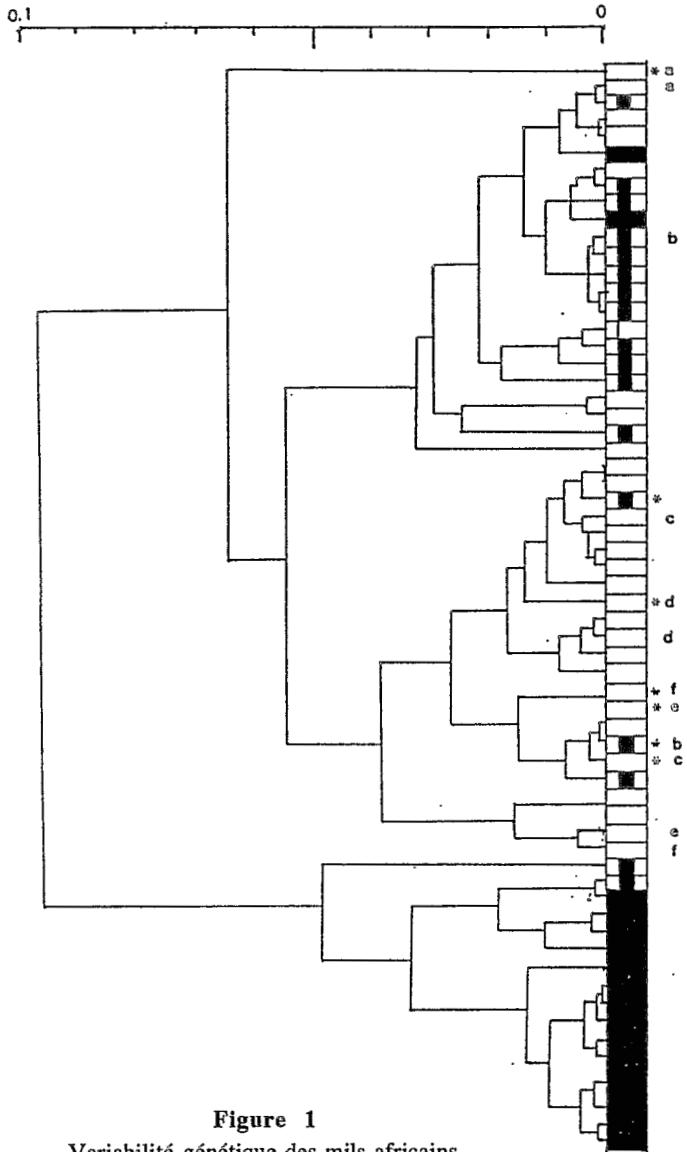


Figure 1

Variabilité génétique des mils africains

: Afrique de l'Ouest (Mauritanie, Sénégal, Mali, Burkina Faso)

: Afrique Centrale (Soudan, RCA, Cameroun, Niger)

: Afrique de l'Est (Kenya, Zambie, Tanzanie, Ouganda)

*: Mils sauvages

Les lettres indiquent des couples (sauvage-cultivé) récoltés dans le même village.