

**Etude du polymorphisme moléculaire par AFLP d'accessions d'*H. coronarium* en Tunisie**

Marghali S., Trifi-Farah N., Ghariani S., Marrakchi M.

*in*

Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.).  
Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens

Zaragoza : CIHEAM  
Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62

2004  
pages 85-88

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=4600135>

To cite this article / Pour citer cet article

Marghali S., Trifi-Farah N., Ghariani S., Marrakchi M. **Etude du polymorphisme moléculaire par AFLP d'accessions d'*H. coronarium* en Tunisie.** In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). *Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens*. Zaragoza : CIHEAM, 2004. p. 85-88 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62)



<http://www.ciheam.org/>  
<http://om.ciheam.org/>

# Etude du polymorphisme moléculaire par AFLP d'accessions d'*H. coronarium* en Tunisie

S. Marghali, N. Trifi-Farah, S. Ghariani et M. Marrakchi

Laboratoire de Génétique Moléculaire, Immunologie et Biotechnologie,  
Faculté des Sciences de Tunis, Campus universitaire, 2092 El Manar, Tunis, Tunisie  
e-mail : sonia.marghali@fst.rnu.tn

---

**SUMMARY** – "Study of molecular polymorphism in *H. coronarium* accessions by AFLP in Tunisia". The study of genetic diversity in *Hedysarum coronarium* L. has been performed using AFLP analysis in individuals representing two spontaneous local populations and one cultivar. We first showed that the technique can be used efficiently with *H. coronarium*. A total of 178 bands were amplified, among which 150 revealed polymorphism. Genetic relationships among different individuals were assessed based on a Nei and Li's distance matrix using the construction of UPGMA. The analyses show that there is an important genetic variability between these *H. coronarium* populations examined with opposite geotropism. The results are discussed in the view of implementing fodder improvement programmes aimed at limiting the erosion of genetic diversity of pasture land.

**Key words:** AFLP, *Hedysarum coronarium*, genetic diversity.

---

## Introduction

Le genre *Hedysarum* renferme des espèces légumineuses papilionacées appartenant soit au groupe des espèces Alpines, Arctiques et Asiatiques ( $2n=14$ ), soit au groupe Méditerranéen ( $2n=16$ ). En Tunisie, parmi les espèces du groupe Méditerranéen, *Hedysarum coronarium* (légumineuse papilionacée), appelée couramment Sulla ou Sainfoin d'Espagne, est la seule espèce cultivée au Nord du pays pour la production de fourrage. Elle est préférentiellement allogame avec un faible pourcentage d'autogamie (10%). A l'état spontané, cette espèce présente une large aire de répartition géographique et pousse sur des sols argilo-marneux bien drainés. *H. coronarium* a déjà fait l'objet de plusieurs travaux de recherche qui sont essentiellement axés sur l'étude de sa reproduction et l'analyse de sa variabilité morphologique, iso-enzymatique et moléculaire par RFLP (Boussaïd *et al.*, 1995 ; Trifi-Farah *et al.*, 2000). L'analyse de la variabilité morphologique a montré l'existence d'une opposition entre les formes spontanées locales à tendance plagiotrope et les cultivars à tendance orthotrope. De plus, il existe également en Tunisie, deux types de plantes naturelles locales ayant une architecture opposée.

Dans le but d'améliorer cette espèce pour son utilisation comme plante de pâturage en Tunisie, une analyse de la variabilité génétique des peuplements naturels et des cultivars paraît nécessaire tant du point de vue fondamental que sur le plan appliqué afin de créer un nouveau matériel synthétique qui servira à la mise en place d'une cartographie de cette espèce. Pour ce faire, nous avons utilisé des marqueurs génétiques moléculaires AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.*, 1995). Ces marqueurs ont déjà été exploités chez des espèces du genre *Hedysarum* en vue d'analyser sa diversité interspécifique (Marghali *et al.*, 2002).

## Matériel et méthodes

Dans cette étude, nous avons considéré deux populations naturelles spontanées caractérisées par des ports architecturaux opposés originaires de El Haouaria et Oued Zit, ainsi qu'un cultivar de la région de Mateur. L'ADN a été extrait à partir de différents individus ayant atteint le stade 3 feuilles en utilisant le kit Quiagen. Ainsi, l'analyse a concerné deux plantes correspondants au cultivar (S<sub>73</sub> et S<sub>75</sub>), cinq issus de la population d'El Haouaria (E<sub>30</sub>, E<sub>42</sub>, E<sub>63</sub>, E<sub>73</sub> et E<sub>76</sub>) et quatre de la population de Oued Zit (Z<sub>20</sub>, Z<sub>33</sub>, Z<sub>58</sub> et Z<sub>74</sub>).

L'analyse du polymorphisme moléculaire par la technique AFLP a été établie à partir du « kit AFLP system analysis » avec quelques modifications. La digestion de l'ADN génomique (250ng) est réalisée à 37°C pendant 4h à l'aide des enzymes *EcoRI* et *MseI*. Après inactivation des enzymes de restriction, les fragments de restriction sont ligués à des adaptateurs de séquence connue pendant 3 heures à 16°C. A la suite de la préamplification réalisée à l'aide d'amorces complémentaires aux adaptateurs, l'amplification sélective est effectuée à l'aide de 5 combinaisons d'amorces ayant 3 nucléotides sélectifs du côté 3' (Tableau 1). La séparation des fragments amplifiés se fait par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant à 6% révélé au nitrate d'argent (Bassam *et al.*, 1991). Les profils d'amplification sont interprétés en attribuant le chiffre 1 si la bande est présente et le chiffre 0 si elle est absente, ce qui permet de générer une matrice binaire des données. Cette dernière est traitée par le programme GENEDIST (version 3.572c) pour estimer les distances génétiques entre les individus. Ainsi sur la base de la méthode UPGMA, la matrice des distances génétiques est utilisée afin d'établir les arbres phylogénétiques (Nei et Li, 1979).

Tableau 1. Variabilité des marqueurs AFLP chez *Hedysarum coronarium* L.

Amorces <i>EcoRI MseI</i>	Nombre de bandes Observées clairement	Nombre de bandes polymorphes	% de bandes polymorphes
AAC CAG	37	28	75,6
ACT CTG	35	30	85,7
AGC CTT	33	29	87,8
AAC CAA	39	31	79,5
AGC CAA	34	32	94

## Résultats et discussion

Dans le but d'étudier le polymorphisme moléculaire de l'espèce *H. coronarium* et afin d'identifier des marqueurs AFLP en relation avec l'architecture de la plante, nous avons choisi deux populations spontanées de cette espèce à géotropisme opposé. Il s'agit de la population de El Haouaria qui est caractérisée par des plantes à port rampant et celle de Oued Zit qui présente un certain redressement du port. Le cultivar est caractérisé par un port érigé. Grâce à la technique AFLP, plusieurs expériences ont permis d'analyser tout en les caractérisant les deux populations sus-présentées ainsi que le cultivar. Dans ce contexte, les résultats révèlent une empreinte génétique nette avec la présence d'un nombre important de bandes pour chaque ADN étudié. Les profils AFLP ont été générés à l'aide de 5 combinaisons d'amorces (Tableau 1).

Une première approche de l'analyse de la variabilité génétique a consisté à estimer le nombre de bandes polymorphes d'après les bandes révélées sur gel de polyacrylamide. L'analyse des résultats observés nous a permis de recenser un total de 178 bandes dont 150 se sont montrées polymorphes. D'où sur l'ensemble des populations analysées dans le présent travail, on remarque une importante variabilité génétique avec un taux de bandes polymorphes égal à 84.4%. Par ailleurs, pour un même ADN et en utilisant différentes combinaisons d'amorces, une variabilité des empreintes génétiques est également obtenue. Le nombre total de bandes polymorphes trouvé dépend donc autant de la complexité du génome étudié que du couple d'amorces utilisé. Le nombre de bandes polymorphes par paire d'amorces exploitée varie de 28 pour la combinaison  $E_{AAC}/M_{CAG}$  à 32 pour le couple  $E_{AGC}/M_{CAA}$  avec une moyenne de 30 bandes polymorphes par combinaison utilisée.

Concernant la caractérisation moléculaire, l'analyse de la matrice des distances génétiques obtenue, basée sur les marqueurs AFLP (Tableau 2), nous montre que les distances génétiques entre les différents individus varient entre 0.212 et 0.757. Il en découle qu'il existe une grande diversité génétique au niveau moléculaire entre les 11 individus étudiés. Par ailleurs, la distance génétique la plus faible  $d=0.212$  se situe entre les individus  $Z_{58}$  et  $Z_{74}$  appartenant à la population de Oued Zit. Par conséquent, ces deux individus présentent le maximum de similitudes au niveau de leur ADN. D'autre part, la distance génétique la plus élevée  $d=0.757$  se trouve entre l'individu  $Z_{58}$  de la population de Oued Zit et l'individu  $E_{63}$  appartenant à la population de El Haouaria. Il en résulte que ces deux individus sont les plus divergents au niveau de leur ADN.

Tableau 2. Matrice des distances génétiques basée sur les marqueurs AFLP chez *H. coronarium*

Z <sub>58</sub>										
Z <sub>74</sub>	0.212									
Z <sub>20</sub>	0.618	0.502								
Z <sub>33</sub>	0.622	0.510	0.236							
E <sub>73</sub>	0.435	0.386	0.662	0.700						
E <sub>30</sub>	0.520	0.619	0.444	0.456	0.662					
E <sub>76</sub>	0.595	0.628	0.551	0.500	0.540	0.386				
E <sub>42</sub>	0.570	0.637	0.437	0.503	0.516	0.385	0.539			
E <sub>63</sub>	0.757	0.637	0.437	0.533	0.576	0.464	0.405	0.544		
S <sub>73</sub>	0.590	0.564	0.397	0.436	0.708	0.543	0.625	0.471	0.471	
S <sub>75</sub>	0.663	0.491	0.386	0.399	0.512	0.386	0.479	0.570	0.638	0.417

La matrice des distances génétiques a permis de schématiser les relations phylogénétiques entre ces individus sous forme d'arbres phylogénétiques. La Fig. 1 représente l'arbre phylogénétique ainsi obtenu. Elle révèle la séparation en deux embranchements témoignant de la divergence de deux groupes, un groupe incluant deux individus Z<sub>58</sub> et Z<sub>74</sub> de la population de Oued Zit et un individu E<sub>73</sub> de la population de El Haouaria; l'autre comprend tous les autres individus. Ainsi, afin de réaliser des croisements entre individus les plus éloignés phylogénétiquement le choix a porté sur les individus Z<sub>58</sub> et E<sub>63</sub> qui seront impliqués dans des croisements en vue d'analyser la ségrégation de la descendance F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub>. Cette analyse complétée par les données morphologiques nous permettra d'établir la carte génétique de *H. coronarium* L. et d'envisager un programme d'amélioration génétique de l'espèce assistée par des marqueurs moléculaires.

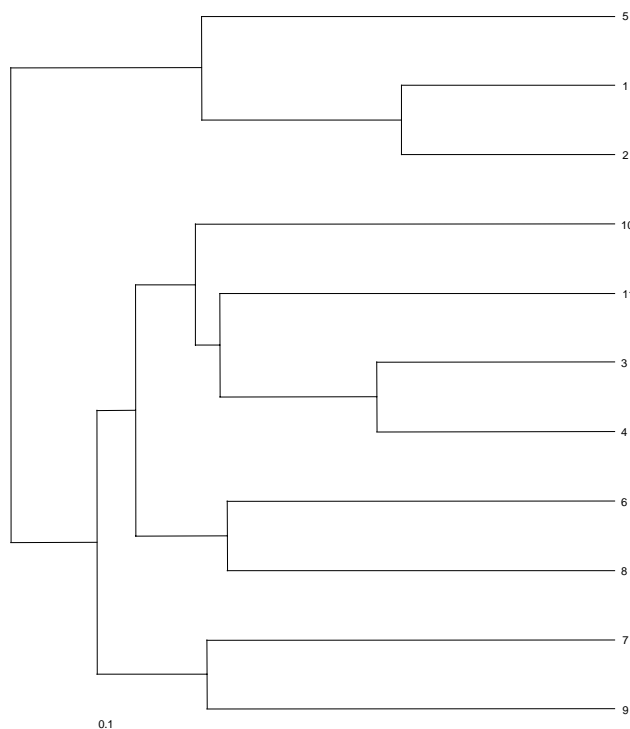


Fig. 1. Arbre phylogénétique regroupant les 11 individus analysés par AFLP (1: Z<sub>58</sub>; 2: Z<sub>74</sub>; 3: Z<sub>20</sub>; 4: Z<sub>33</sub>; 5: E<sub>73</sub>; 6: E<sub>30</sub>; 7: E<sub>76</sub>; 8: E<sub>42</sub>; 9: E<sub>63</sub>; 10: S<sub>73</sub>; 11: S<sub>75</sub>).

## Conclusions

La plupart des fragments AFLP correspondent à une position unique dans le génome, et de ce fait, ils seront exploités en tant que point de repère ou marqueurs au niveau de cartes génétiques.

Chaque fragment est caractérisé par sa taille et les amorces requises pour son amplification. L'utilisation des marqueurs moléculaires AFLP semble, de ce fait, prometteuse pour la cartographie et la détection de QTL liés à des gènes d'intérêt. Ainsi les croisements entre plantes parentales Z<sub>58</sub> et E<sub>63</sub> spontanées opposées vis à vis de leur géotropisme, caractérisées d'un point de vue morphologique et moléculaire, nous permettront de réaliser la création de matériel recombinant amélioré. En effet, chez *H. coronarium*, la recherche de gènes impliqués dans le développement de la plante (architecture) est importante pour l'exploitation agronomique par la création de matériel amélioré et adapté aux conditions du milieu.

## Remerciements

Nos remerciements s'adressent au Ministère de l'Enseignement Supérieur (Direction Générale de la Recherche Scientifique et Technique), au Ministère de la Recherche Scientifique et de la Technologie et à l'Agence de Coopération Culturelle et Technique. Ce travail a été réalisé grâce à l'appui de la Coopération Scientifique Française (Institut Français de Coopération auprès de l'ambassade de France en Tunisie).

## Références

- Bassam B.J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 196 : 80-83.
- Boussaïd M., Ben Fadhel N., Trifi-Farah N., Marrakchi M. (1995) Mediterranean species of *Hedysarum* genus. Genetic resources of forage and grass plants (I.N.R.A. and B.R.G. France ed.) : 115-130.
- Marghali S., Trifi-Farah N., Ghariani S., Marrakchi M. (2002) Exploration of the genetic diversity in *Hedysarum* genus detected by AFLPs. *Grassland Science in Europe* volume 7.
- Nei, M. and Li, W.S. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 76 : 5269-5273.
- Trifi-Farah N., Chatti, W.S., Marrakchi, M., Pernes J. (1989) Analyse de la variabilité morphologique et enzymatique des formes cultivées et spontanées de *Hedysarum coronarium* L. en Tunisie. *Agronomie*, 9 : 591-598.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 : 4407-4414.