



**HAL**  
open science

## Mise en évidence de 4 locus enzymatiques chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) di- et tétraploïde

Dominique Brunel

► **To cite this version:**

Dominique Brunel. Mise en évidence de 4 locus enzymatiques chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) di- et tétraploïde. *Agronomie*, 1982, 2 (2), pp.133-148. hal-00884363

**HAL Id: hal-00884363**

**<https://hal.science/hal-00884363>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Mise en évidence de 4 locus enzymatiques chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) di- et tétraploïde

Dominique BRUNEL\*

Ecole normale supérieure, Laboratoire de Zoologie, 46, rue d'Ulm, F 75230 Paris Cedex 05.

## RÉSUMÉ

*Medicago sativa*,  
Luzerne,  
Autotétraploïdie,  
Déterminisme génétique,  
Glutamate oxaloacétate  
transaminase,  
Leucine,  
Amino peptidases,  
 $\beta$ -amylase,  
Phosphatases acides,  
Electrophorèse,  
Polymorphisme enzyma-  
tique.

La recherche du déterminisme génétique de 4 systèmes enzymatiques, révélés par électrophorèse, a été entreprise sur des individus diploïdes d'une population naturelle de *Medicago sativa* subsp. *coerulea*. Des hypothèses ont été faites sur le mode de transmission héréditaire des bandes électrophorétiques et des plantes parentales ont été choisies en vue de croisements. L'étude des descendance a permis de mettre en évidence 4 locus :

- Système « Leucine Aminopeptidase » : locus Lap 1 avec 4 allèles dont 1 nul, locus Lap 2 avec 3 allèles.
- Système « Glutamate Oxaloacétate Transaminase » : locus Got avec 2 allèles.
- Système «  $\beta$ -Amylase » : locus  $\beta$ -Amy avec 3 allèles.
- Le déterminisme génétique n'a pas pu être élucidé pour le système « Phosphatases Acides ».

Des individus tétraploïdes, provenant d'une population naturelle de *Medicago sativa* subsp. *sativa* ont été analysés par la suite. Les mêmes bandes que chez les individus diploïdes sont observées, mais avec des intensités variables, qui reflètent probablement des différences dans le dosage allélique. Pour les locus Lap 1, Lap 2 et  $\beta$ -Amy, les premiers résultats semblent confirmer cette hypothèse. Le génotype d'un individu pourrait donc être déterminé par simple lecture de son zymogramme.

Une comparaison de la variabilité enzymatique des populations diploïde et tétraploïde a été effectuée. Pour les 4 locus, les échantillons des populations diploïde et tétraploïde présentent des proportions génotypiques compatibles avec l'hypothèse de panmixie et pour chaque système la forme allélique prépondérante est la même aux deux niveaux de ploïdie. Ces deux faits permettent d'expliquer le faible nombre d'individus trigénique et tétragénique dans la population tétraploïde bien que 3 ou 4 allèles existent pour chaque locus.

## SUMMARY

*Medicago sativa*,  
Alfalfa,  
Autotetraploidy,  
Glutamate oxaloacetic  
transaminase,  
Leucine,  
Amino peptidases,  
 $\beta$  amylase,  
Acid phosphatases,  
Gel electrophoresis,  
Enzyme polymorphism.

## Genetic determination of 4 enzymatic loci in di- and tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.)

The genetic determination of 4 enzyme systems was examined in diploid plants of a natural population of *Medicago sativa* subsp. *coerulea*. Hypotheses were made on the genetic transmission of bands obtained by polyacrylamide gel electrophoresis, and appropriate parental plants were chosen for crosses. Study of the offspring revealed four loci :

- « Leucine Amino Peptidase » system : — locus Lap 1 with 4 alleles of which 1 is null,  
— locus Lap 2 with 3 alleles.
- « Glutamate Oxaloacetate Transaminase » system : locus Got with 2 alleles.
- «  $\beta$  Amylase » system : locus  $\beta$  Amy with 3 alleles.
- The genetic determination of the « acid phosphatase » system could not be elucidated.

Tetraploid plants of a natural population of *Medicago sativa* subsp. *sativa* were then analysed. The same bands as in the diploid plants were observed but with variable intensities, which were supposed to reflect differences in allelic dosage. For loci Lap 1, Lap 2 and  $\beta$  Amy, these first results seem to confirm this hypothesis. The genotype of one plant could be determined by simple reading of its zymogram.

A comparison of enzyme variability in diploid and tetraploid populations was made. For all four loci, the samples showed genotype ratios consistent with a hypothesis of panmixia, and one predominant allelic form which is the same at both ploidy levels. These two facts may explain the low number of trigenic and tetragenic plants in the tetraploid population, although 3 or 4 alleles exist at each locus.

## I. INTRODUCTION

De grande valeur économique, l'espèce *Medicago sativa* (et au-delà, tout le genre *Medicago*) présente un intérêt

scientifique fondamental. En effet, il existe au sein du genre *Medicago* des espèces di- et tétraploïdes, annuelles et pérennes, allogames et autogames. Cependant les études génétiques sont compliquées chez la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) par le niveau tétraploïde du génome qui entraîne de nombreuses interactions entre les locus. Les caractères morphologiques, dont on connaît le déterminisme tels que la pigmentation florale, le nanisme, les

\* Nouvelle adresse : I.N.R.A. Station d'Amélioration des Arbres forestiers, Centre de Recherches d'Orléans, Ardon, F 45160 Olivet.

déficiences chlorophylliennes..., sont peu nombreux et d'usage difficile pour suivre l'évolution des structures génotypiques en fonction du système de reproduction. De plus, étant donné le mode de pollinisation strictement entomophile et les phénomènes de compétition entre plantes voisines très importants chez cette espèce, ces caractères n'ont probablement pas un comportement neutre.

Les marqueurs enzymatiques, révélés par électrophorèse, permettent maintenant d'étudier un grand nombre de caractères dont le déterminisme génétique est généralement plus simple que celui de caractères morphologiques. L'observation du phénotype se faisant à un niveau proche du produit du gène, les variations dues au milieu extérieur se trouvent limitées.

Très peu d'études ont été entreprises jusqu'à présent pour rechercher le déterminisme génétique des marqueurs enzymatiques chez les espèces autotétraploïdes car les effectifs des descendances à analyser sont importants et il est souvent difficile de trancher entre les diverses hypothèses sur le mode de transmission héréditaire. Cependant il existe au moins deux exemples où l'identification des génotypes tétraploïdes a été réalisée : cas du locus Glutamate oxaloacétate transaminase chez *Dactylis glomerata* (LUMARET & VALDEYRON, 1978) et du locus Phosphoglucose Isomerase Pgi chez *Lolium spp.* (NIELSEN, 1980).

Les premiers travaux utilisant l'électrophorèse sur la luzerne et des espèces voisines ont été publiés en 1971 par PRZYBYLSKA & HURICH. Ces auteurs ont montré que les pourcentages de similitude entre les protéinogrammes étaient en bonne corrélation avec les caractères morphologiques et cytologiques. MARIANI (1978) a pu conclure à l'existence probable d'un ancêtre commun avec *Medicago glutinosa*. On peut donc penser que l'électrophorèse se révélera un bon outil pour des études systématiques du genre *Medicago*.

Par ailleurs, l'électrophorèse a été utilisée chez la luzerne pour rechercher une clef d'identification d'une soixantaine de clones à l'aide de protéinogrammes et des zymogrammes d'estérases et de peroxydases. En fait peu d'entre eux ont pu être classés individuellement (DELOSS FORD, 1973). DE VIENNE (1978) a cependant montré, sur le pollen, que les variables enzymatiques discriminaient mieux des familles apparentées que des variables biométriques telle que la longueur du tube pollinique et le taux d'autofertilité. L'évolution de ces variables, sous divers systèmes de production, est compatible avec des modèles simples de génétique des populations.

Une autre utilisation de l'électrophorèse, chez *Medicago sativa*, a été la recherche de marqueurs de résistance au froid (KRASNUCK *et al.*, 1976) par l'analyse de 2 variétés, l'une résistante et l'autre sensible, pour 4 systèmes d'enzymes ayant des propriétés hydrolytiques. Aucun marqueur de résistance n'a pu être mis en évidence.

Dans un court article, QUIROS (1979) indique que l'étude de plusieurs provenances de *Medicago sativa* et *falcata*, espèces diploïdes et interfertiles, lui a permis de révéler par électrophorèse sur gel d'amidon 5 locus de « peroxydases » et 2 locus de « leucine aminopeptidases ». Cependant, il ne précise pas si des croisements ont été réalisés pour confirmer ces hypothèses. Ces systèmes, ainsi que les « estérases » ont été utilisés avec efficacité, dans une 2<sup>e</sup> étude pour l'identification d'une vingtaine de plantes tétraploïdes (QUIROS, 1980).

Une première recherche du déterminisme génétique de 4 systèmes enzymatiques a donc été faite sur des individus diploïdes, appartenant à une population de *Medicago sativa* subsp. *coerulea*, afin de limiter les effectifs à analyser et de

simplifier les hypothèses à formuler. Une deuxième étude a été ensuite entreprise sur des individus tétraploïdes de *Medicago sativa* subsp. *sativa* afin de déterminer s'il était possible de connaître la structure génotypique d'un individu tétraploïde par la simple lecture de son zymogramme.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. Matériel

#### 1. Origine de la population diploïde

La population diploïde analysée a été récoltée en 1953 en Transcaucasie puis probablement multipliée au Canada. Elle fait partie de l'espèce *Medicago coerulea* ( $2n = 16$ ) qui est, en fait, considérée comme une sous-espèce de *Medicago sativa* ( $2n = 4x = 32$ ) (GILLIES, 1972). En effet, de nombreuses caractéristiques morphologiques et cytologiques sont comparables. La distinction entre les 2 niveaux de ploïdie se fait sur les tailles de gousses, des graines et des fleurs, en moyenne plus petites chez *Medicago sativa* subsp. *coerulea* que chez *Medicago sativa* subsp. *sativa*. 71 plantes diploïdes ont été utilisées dans cette étude.

#### 2. Origine de la population tétraploïde

L'échantillon de plantes tétraploïdes analysées appartient à la population « Flamande » de *Medicago sativa*, récoltée dans le Nord de la France et conservée à Versailles au Groupement d'Etude et de contrôle des Variétés et des Semences (G.E.V.E.S.). De nombreuses variétés de luzerne, actuellement cultivées, proviennent, totalement ou en partie de ce pool génétique ; 84 individus de cette population ont été analysés.

### B. Méthodes

La technique utilisée, l'électrophorèse, permet d'étudier les formes multiples d'enzymes, que nous appellerons ici isoenzymes, issues d'un même organisme, ayant la même fonction catalytique et résultant de différences dans la structure de la molécule.

Les extraits sont obtenus à partir d'une dizaine de feuilles prélevées, alors qu'elles ne sont pas encore complètement dépliées, à l'apex des différentes ramifications d'une plante. Le broyage s'effectue dans un tampon Tris 10 m M, KCL 25 m M, pH 7. L'extraction se fait en enveloppant un potter de « KONTES » dans un manchon de glace pilée. Après 2 mn de broyage, l'extrait est centrifugé à 11 000 t/mn pendant 15 mn et le surnageant est réparti dans des tubes de polypropylène contenant quelques cristaux de saccharose qui, après dilution, augmenteront sa densité. Les extraits sont conservés au congélateur à  $-30^{\circ}\text{C}$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$ . La migration des protéines s'effectue dans un gel de polyacrylamide à 10 p. 100 de  $8\text{ cm} \times 8\text{ cm} \times 0,3\text{ cm}$ . Le tampon de migration, Tris 89 m M a.borique 89 m M EDTA  $25 \cdot 10^{-1}\text{ M}$  ph 8,3 (PEACOK & DINGMAN, 1967) est identique dans la cuve d'électrophorèse et dans les gels. A ce tampon est ajouté un détergent non ionique, le Sinopal NP 40, à la concentration 0,05 p. 100, qui améliore la résolution et intensifie la couleur des bandes (DE VIENNE, comm. pers.). 16 systèmes ont été essayés parmi lesquels 4 ont été retenus pour leur bonne répétabilité, leur lecture aisée et le polymorphisme observé entre les individus. Il s'agit des systèmes glutamate oxaloacétate transaminase (GOT ; E.C. : 2.6.1.1.), leucine amino peptidase (LAP ; E.C. 3.4.1.1.), ( $\beta$ -Amy ; E.C. 3.2.1.2.) et phosphatases

acides (PA ; E.C. 3.1.3.2.). Les solutions de révélation sont indiquées en annexe (BRUNEL, 1979).

La répétabilité a été confirmée en faisant les manipulations 2 fois sur les mêmes extraits puis avec de nouveaux extraits de la même plante.

### III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Trois points sont à noter avant de présenter les résultats :

1. La lecture des zymogrammes (\*) et des données bibliographiques ont permis de formuler des hypothèses sur le déterminisme génétique des bandes. Ces hypothèses ont été éprouvées par l'analyse des descendance de croisements contrôlés entre parents choisis pour leurs caractéristiques électrophorétiques.

Il a semblé plus intéressant de réaliser plusieurs croisements du même type en limitant les effectifs des descendance plutôt qu'un seul croisement comportant un plus grand nombre de descendants.

2. Une étude préliminaire réalisée sur des individus diploïdes et tétraploïdes ayant permis de constater que l'on retrouvait des bandes migrant au même niveau sur le gel quel que soit le degré de ploïdie, mais dont l'intensité était variable chez les tétraploïdes, nous a permis de formuler 2 hypothèses :

— La première hypothèse émise est que les locus mis en évidence chez les diploïdes sont homologues de ceux existant chez les tétraploïdes. Toutefois, la confirmation indiscutable de cette hypothèse proviendrait de l'étude d'individus autotétraploïdes obtenus artificiellement par doublement de génomes diploïdes.

— La deuxième est que les différences d'intensité observées selon les individus tétraploïdes reflètent des différences dans le dosage allélique et qu'il est possible de distinguer les génotypes aabb, aaab et abbb au vu de leurs zymogrammes. En effet, une corrélation linéaire entre le dosage allélique et l'activité enzymatique correspondante a été trouvée pour la plupart des systèmes étudiés chez des organismes aussi variés que *Saccharomyces* (CIFERRI *et al.*, 1969) *Datura*, *Hordeum* et dans les cultures de cellules de mammifères, tels que la souris (FABER, 1973) et l'homme. Néanmoins, il existe des exemples, notamment chez la drosophile, où aucune différence d'activité enzymatique n'a été mise en évidence en fonction du degré de ploïdie (VRIJENHOEK, 1975).

Le déterminisme génétique étant supposé connu par l'étude des diploïdes, les bandes correspondant au fonctionnement d'allèles différents ont été notées selon leur intensité relative par des coefficients égaux à 1, 2, 3, ou 4 (un allèle ne pouvant être présent au plus que 4 fois chez un même individu tétraploïde). Par exemple, si 2 bandes correspondant au même locus Loc X ont même intensité, elles seront notées chacune avec un coefficient 2, soit {2 a 2 b} qui correspond à un individu digénique duplex. Les génotypes sont alors distingués par des exposants qui correspondent au nombre de fois où l'allèle est représenté dans un individu. Par exemple {2 a 2 b} correspond au génotype  $(\text{Loc } X_a)^2 \cdot (\text{Loc } X_b)^2$ . Les bandes ont été notées une première fois par lecture directe en assignant à chacune un coefficient. Un spectrophotomètre, utilisé par la suite,

n'a pas donné de résultats plus intéressants que la lecture directe. Bien que permettant le stockage des résultats avec une perte minimum d'information, l'utilisation du densitomètre est fastidieuse et ne facilite pas l'interprétation.

3. Les ségrégations attendues pour les différents croisements entre individus tétraploïdes ont été calculées en tenant compte de la structure autotétraploïde de la luzerne. Plus précisément, les proportions observées ont été comparées à celles attendues pour un indice de séparation,  $\alpha = 0$ , probabilité pour un gamète de posséder 2 allèles frères (DEMARLY, 1964).

#### A. Système GOT : glutamate oxaloacétate transaminase

D'après de nombreuses études génétiques, cette enzyme fonctionne sous forme de dimère notamment chez *Zea mays* (Mac DONALD & BREWBAKER, 1972 ; SCANDALIOS *et al.*, 1975), *Stephanomeria exigua* (GOTTLIEB, 1973), *Triticum aestivum*, *Secale cereale* et *Agropyron elongatum* (HART, 1975 ; TANG & HART, 1975 ; HART *et al.*, 1976), *Dactylis glomerata* (LUMARET, 1977), *Pinus nigra* (BONNET-MASIMBERT & BIKAY-BIKAY, 1978).

Ces résultats ont été confirmés par des expériences de dissociation et de réassociation des sous-unités (HART, 1977).

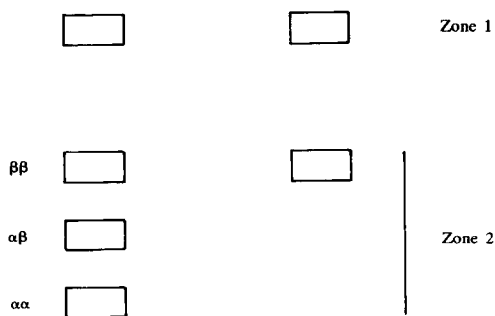
##### 1. Analyse des individus diploïdes ; hypothèses sur le déterminisme génétique

Sur les gels 2 zones se distinguent (fig. 1) :

— Zone 1 : tous les individus analysés présentent la même bande. Aucune hypothèse n'a pu être formulée ni testée.

— Zone 2 : 70 individus présentent la même bande, 1 individu présente 3 bandes dont une commune avec les 70 autres individus.

##### Zymogrammes des individus diploïdes



##### Génotypes correspondants

(Got<sub>a</sub> — Got<sub>b</sub>)                      (Got<sub>b</sub>)<sup>2</sup>

##### Effectif

1    70

Figure 1  
Système « Glutamate-Oxaloacétate-Transaminase ».  
" Glutamate-Oxaloacetate-Transaminase " system.

Compte tenu des résultats bibliographiques sur des espèces appartenant à des genres très différents, l'hypothèse émise pour le déterminisme génétique a été l'existence dans la population de 2 allèles d'un même locus Got<sub>a</sub> et Got<sub>b</sub>. Got<sub>a</sub> produirait la sous-unité α et Got<sub>b</sub> la sous-unité β. Les

(\*) L'auteur s'excuse de ne pas pouvoir présenter, pour des raisons matérielles, les photographies des zymogrammes mais se propose de les envoyer à toute personne qui en ferait la demande.

TABLEAU 1

Recherche du déterminisme génétique du système « Glutamate oxaloacétate transaminase » : résultats des descendance des croisements entre diploïdes.

Genetic determination of the « Glutamate oxaloacetate transaminase » system : results on the offspring of crosses between diploids.

	Croisement réalisé	Descendance attendue	Descendance obtenue	Effectif
Zylogrammes	{ b } × { abc }			
Génotypes correspondants	$(\text{Got}_b)^2 \times (\text{Got}_a - \text{Got}_b)$ ♀ D68 × ♂ D69	$\frac{1}{2}(\text{Got}_b)^2; \frac{1}{2}(\text{Got}_a - \text{Got}_b)$	{ b } = 7 { abc } = 8	N = 15
Zylogrammes	{ b } × { b }	100 % { b }		
Génotypes correspondants	$(\text{Got}_b)^2 \times (\text{Got}_b)^2$ D15 × D53	$(\text{Got}_b)^2$	b = 35	N = 35

70 individus possédant une seule bande (appelée b) seraient homozygotes  $(\text{Got}_b)^2$ , l'enzyme étant sous la formule  $\beta\beta$ . L'individu à 3 bandes (appelées a, b et c) serait hétérozygote  $(\text{Got}_a - \text{Got}_b)$  et posséderait donc les 3 formes fonctionnelles  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  et  $\beta\beta$ .

### 2. Test de l'hypothèse génétique : analyse des descendance de croisements

Il n'existait dans l'échantillon étudié qu'un seul individu à 3 bandes, peu florifère. Il a été croisé avec un individu {b} supposé homozygote afin de tester la présence des 2 phénotypes {b} et {abc} dans les proportions 1.1. Le tableau 1 donne les phénotypes des 15 descendants obtenus ainsi que la composition de la descendance d'un croisement entre 2 individus {b}.

L'autofécondation de l'individu {abc} a été réalisée pour rechercher les phénotypes {a}, {b} et {abc} attendus dans un rapport 1.2.1. mais la descendance n'était pas viable.

### 3. Conclusion

Les résultats sont compatibles avec l'existence de 2 formes alléliques d'un gène codant pour une enzyme glutamate oxaloacétate transaminase qui fonctionne sous forme de dimère dans le genre *Medicago*.

### 4. Analyse des individus tétraploïdes

Le locus Got s'est révélé monomorphe pour l'échantillon de la population tétraploïde. Tous les individus présentent une bande migrant au même niveau que la bande b des individus diploïdes et sont donc  $(\text{Got}_b)^4$ . Aucun croisement n'a donc été réalisé.

## B. Système LAP : leucine amino peptidase

De nombreux résultats génétiques sur *Zea mays* (SCANDALIOS, 1969), *Pisum sativum* (SCANDALIOS & CAMPEAU, 1972; SCANDALIOS & ESPIRITU, 1969), *Picea abies* (LUNDKVIST, 1974), *Pinus sylvestris* (RUDIN, 1977), permettent de conclure à la nature monomérique de la forme fonctionnelle des LAP.

### 1. Analyse des individus diploïdes

Sur les zymogrammes, 3 zones peuvent être distinguées en allant des bandes les plus rapides vers les plus lentes (fig. 2) :

— Zone 1 : 3 bandes appelées a, b et c sont observées dans l'échantillon, chaque individu n'en présente qu'une ou deux, 1 individu ne possède aucune bande.

— Zone 2 : 3 bandes appelées f, g et h sont observées et comme pour la zone 1, chaque individu n'en présente qu'une ou deux.

— Zone 3 : il existe 2 bandes (d et e) de faible intensité et présentes chez tous les individus. Aucune hypothèse ne peut être formulée ni testée.

### 2. Etude de la zone 1 des zymogrammes

#### a) Hypothèse sur le déterminisme génétique

Les données bibliographiques et l'analyse des zymogrammes laissent supposer que la zone 1 correspond au produit de fonctionnement d'un gène à 4 allèles codominants Lap 1<sub>a</sub>, Lap 1<sub>b</sub>, Lap 1<sub>c</sub> et Lap 1<sub>nu</sub>. L'existence d'un allèle nul dans la population expliquerait l'absence d'activité enzymatique chez un individu de génotype  $(\text{Lap } 1_{\text{nu}})^2$ .

#### b) Test de l'hypothèse génétique : analyse des descendance de croisements choisis

Tous les croisements envisageables n'ont pu être réalisés car les individus intéressants n'existaient pas toujours dans l'échantillon de la population ou étaient morts entre le moment de l'analyse et le début des croisements. Les croisements réalisés et les descendance obtenues sont indiqués dans le tableau 2.

Certaines valeurs des  $\chi^2$  sont un peu élevées, toutefois au seuil de 5 p. 100 elles ne sont pas significatives. La somme des  $\chi^2$  est aussi un  $\chi^2$  à 8 ddl de valeur 6,41. La probabilité de trouver une valeur de  $\chi^2$  supérieure à 6,41 est de l'ordre de 0,60. L'ensemble de ces résultats est donc compatible avec l'hypothèse émise. Cependant, le croisement D64 × D1 présente dans sa descendance, qui ne devait comprendre que des individus {ab} et {bc}, un individu {b}. Cet individu aberrant peut correspondre soit à une erreur de numérotation au moment de la plantation ou de l'extraction, soit au résultat d'une autofécondation du parent femelle D64 dont le taux d'autofécondation est pourtant très faible.

Malgré ce résultat et tant qu'il n'y aura pas d'autres informations contradictoires, il ne semble pas nécessaire de remettre en cause l'hypothèse formulée. De plus, les quelques résultats obtenus sur des descendants d'autofécondation sont compatibles avec l'hypothèse.

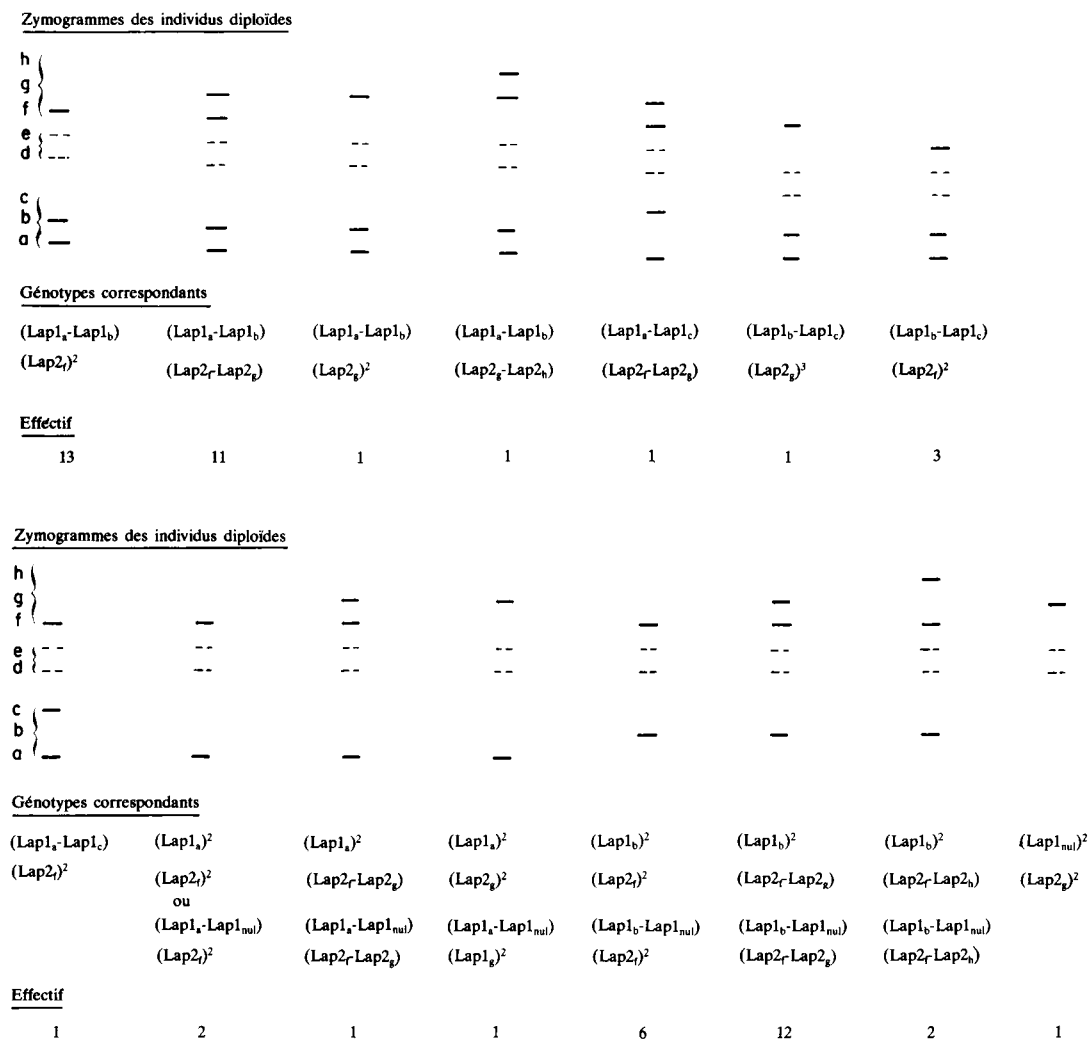


Figure 2  
Système « Leucine-Amino-Peptidase ».  
“ Leucine-Amino-Peptidase ” system.

TABLEAU 2

Recherche du déterminisme génétique de la zone 1 du système « Leucine Amino Peptidase » : résultats des descendance des croisements entre diploïdes.

Genetic determination of zone 1 of the « Leucine Amino Peptidase » system : results on the offspring of crosses between diploids.

	Croisement réalisé	Descendance attendue	Descendance obtenue	Valeur du $\chi^2$ et de P
Zymogrammes	{ b } × { b }	100 % { b }		
Génotypes correspondants	(Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup> × (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup>	(Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup>		
	♀ D17 × ♂ D15		{ b } = 34 N = 34	
	♀ D34 × ♂ D36		{ b } = 15 N = 15	
Zymogrammes	{ nul } × { b }	100 % { b }		
Génotypes correspondants	(Lap 1 <sub>nul</sub> ) <sup>2</sup> × (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup>	(Lap 1 <sub>nul</sub> - Lap 1 <sub>b</sub> )		
	♀ D39 × ♂ D34		{ b } = 31 N = 31	

TABLEAU 2 (suite)

Recherche du déterminisme génétique de la zone 1 du système « Leucine Amino Peptidase » : résultats des descendance des croisements entre diploïdes.

Genetic determination of zone 1 of the « Leucine Amino Peptidase » system : results on the offspring of crosses between diploids.

	Croisement réalisé	Descendance attendue	Descendance obtenue	Valeur du $\chi^2$ et de P
Zymogrammes	{ ab } × { b }	{ b } { ab }	1 1	
Génotypes correspondants	(Lap 1 <sub>a</sub> - Lap 1 <sub>b</sub> ) × (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup>	(Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup> (Lap 1 <sub>a</sub> - Lap 1 <sub>b</sub> )		
	♀ D5 × ♂ D15		{ b } = 40 { ab } = 41 N = 81	$\chi_1^2 = 0,01$ P ≈ 0,92
	♀ D62 × ♂ D64		{ b } = 29 { ab } = 17 N = 46	$\chi_1^2 = 3,1$ P ≈ 0,07
	♀ D15 × ♂ D53		{ b } = 18 { ab } = 17 N = 35	$\chi_1^2 = 0,02$ P ≈ 0,88
Zymogrammes	{ bc } × { b }	{ bc } { b }	1 1	
Génotypes correspondants	(Lap 1 <sub>b</sub> - Lap 1 <sub>c</sub> ) × (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup>	(Lap 1 <sub>b</sub> - Lap 1 <sub>c</sub> ) (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup>		
	♀ D16 × ♂ D41		{ b } = 31 { bc } = 19 N = 50	$\chi_1^2 = 2,88$ P = 0,1
Zymogrammes	{ b } × { ac }	{ ab } { bc }	1 1	
Génotypes correspondants	(Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup> × (Lap 1 <sub>a</sub> - Lap 1 <sub>c</sub> )	(Lap 1 <sub>a</sub> - Lap 1 <sub>b</sub> ) (Lap 1 <sub>b</sub> - Lap 1 <sub>c</sub> )		
	♀ D64 × ♂ D1		{ ab } = 10 { bc } = 14 { b } = 1 N = 25	$\chi_1^2 = 0,33$ P ≈ 0,60
Zymogrammes	{ ac } × { ab }	{ a } 1 ; { ab } 1 { ac } 1 ; { bc } 1		
Génotypes correspondants	(Lap 1 <sub>a</sub> - Lap 1 <sub>c</sub> ) × (Lap 1 <sub>a</sub> - Lap 1 <sub>b</sub> )	(Lap 1 <sub>a</sub> ) <sup>2</sup> (Lap 1 <sub>a</sub> - Lap 1 <sub>b</sub> ) (Lap 1 <sub>a</sub> - Lap 1 <sub>c</sub> ) (Lap 1 <sub>b</sub> - Lap 1 <sub>c</sub> )		
	♀ D59 × ♂ D62		{ a } = 6 { ab } = 7 { ac } = 6 { bc } = 8 N = 27	$\chi_3^2 = 0,40$ P ≈ 0,94
				$\Sigma \chi^2 = \chi_8^2 = 6,41$ P = 0,60

NB<sub>1</sub> : La valeur de  $\chi^2$  du croisement D64 × D1 a été calculée sans tenir compte de l'individu aberrant { b }.

NB<sub>2</sub> : N est l'effectif étudié pour chaque croisement.

NB<sub>3</sub> : P est la probabilité de trouver une valeur de  $\chi^2$  supérieure à la valeur observée.

TABLEAU 3

Confirmation du déterminisme génétique du locus *Lap 1* au niveau tétraploïde : descendance des croisements.  
Confirmation of the genetic determinism of the *Lap 1* locus at the tetraploid level : offsprings of the crosses.

	Croisement réalisé	Descendance attendue	Descendance obtenue	Valeur du $\chi^2$ et de P
Zymogrammes	{ 4b } × { 4b }	100 % { b }		
Génotypes correspondants	(Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>4</sup> × (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>4</sup>	100 % (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>4</sup>		
	♀ T23 × ♂ T28		{ b } = 11 N = 11	
Zymogrammes	{ 2b 2c } × { 4b }	{ 4b } 1 { 3b 1c } 4 { 2b 2c } 1 Si $\alpha = 0$		
Génotypes correspondants	(Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup> (Lap 1 <sub>c</sub> ) <sup>2</sup> × (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>4</sup>	(Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>4</sup> (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>3</sup> (Lap 1 <sub>c</sub> ) (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup> (Lap 1 <sub>c</sub> ) <sup>2</sup>		
	♀ T54 × ♂ T32		{ 4b } = 2 { 3b 1a } = 8 { 2a 2b } = 3 N = 13	impossible d'utiliser le test $\chi^2$
Zymogrammes	{ 4b } × { 2a 2b }	{ 4b } 1 { 3b 1a } 4 { 2a 2b } 1 Si $\alpha = 0$		
Génotypes correspondants	(Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>4</sup> × (Lap 1 <sub>a</sub> ) <sup>2</sup> (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup>	(Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup> (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>3</sup> (Lap 1 <sub>a</sub> ) (Lap 1 <sub>b</sub> ) <sup>2</sup> (Lap 1 <sub>a</sub> ) <sup>2</sup>		
	♀ T18 × ♂ T22		{ 4b } = 19 { 3a 1a } = 48 { 2a 2b } = 17 N = 84	Si $\alpha = 0$ $\chi^2_2 = 3,45$ P ≈ 0,15

NB<sub>1</sub> : P est la probabilité de trouver une valeur de  $\chi^2$  supérieure à la valeur observée.  
NB<sub>2</sub> : N est l'effectif étudié pour chaque croisement.

c) Conclusion

La zone 1 du système leucine amino peptidase est sous le contrôle génétique d'un locus *Lap 1*, 4 allèles étant présents dans l'échantillon.

d) Confirmation au niveau tétraploïde du déterminisme génétique du locus *Lap 1*

Bien que pour le locus *Lap 1* au moins 3 allèles existent dans la population, aucun des individus de l'échantillon ne possède une structure génotypique de type trigénique. Les croisements ont donc été effectués entre les plantes digéniques choisies en tenant compte des différences d'intensité des bandes et des descendance ont été analysées (tabl. 3).

Les faibles effectifs et le petit nombre de croisements étudiés ne permettent pas de conclure avec certitude et on se trouve souvent à la limite des conditions d'utilisation du test  $\chi^2$ . Cependant, les différents phénotypes attendus ont toujours été observés. Il semble donc que les différences d'intensité des bandes correspondent bien à des différences dans le dosage allélique.

3. Etude de la zone 2 des zymogrammes

a) Hypothèse sur le déterminisme génétique

De même que pour la zone 1, les données bibliographiques et la lecture des zymogrammes suggèrent que les 3 bandes f, g et h de la zone 2 correspondent aux produits de 3 allèles codominants d'un même locus *Lap 2<sub>f</sub>*, *Lap 2<sub>g</sub>* et *Lap 2<sub>h</sub>*.

b) Test de l'hypothèse génétique : analyse de la descendance de croisements

Les résultats des différentes descendance des croisements choisis se trouvent dans le tableau 4. Bien que la somme des  $\chi^2$  soit un  $\chi^2$  à 11 ddl de valeur 23,66 donc significative au seuil de 5 p. 100, il semble difficile de rejeter l'hypothèse émise pour 2 raisons :

- toutes les catégories phénotypiques attendues ont été trouvées dans les différentes descendance,
- d'autre part, la valeur élevée de la somme du  $\chi^2$  est essentiellement due à 2 croisements sur les 9 réalisés.



TABLEAU 4

Recherche du déterminisme génétique de la zone 2 du système « Leucine Amino Peptidase : résultats des descendance des croisements entre diploïdes.

Genetic determination of zone 2 of the « Leucine Amino Peptidase » system : results on the offspring of crosses between diploids.

	Croisement réalisé	Descendance attendue	Descendance obtenue	Valeur du $\chi^2$ et de P
Zylogrammes	{ g } × { f }	100 % { fg }		
Génotypes correspondants	(Lap 2 <sub>g</sub> ) <sup>2</sup> × (Lap 2 <sub>f</sub> ) <sup>2</sup>	(Lap 2 <sub>f</sub> - Lap 2 <sub>g</sub> )		
	♀ D39 × ♂ D34		{ fg } = 30 N = 30	
Zylogrammes	{ f } × { fg }	{ f } { fg }	1 1	
Génotypes correspondants	(Lap 2 <sub>f</sub> ) <sup>2</sup> × (Lap 2 <sub>f</sub> - Lap 2 <sub>g</sub> )	(Lap 2 <sub>f</sub> ) <sup>2</sup> (Lap 2 <sub>f</sub> - Lap 2 <sub>g</sub> )		
	♀ D5 × ♂ D15		{ f } = 36 { fg } = 45 N = 81	$\chi_1^2 = 1$ P ≈ 0,31
	♀ D34 × ♂ D36		{ f } = 9 { fg } = 6 N = 15	$\chi_1^2 = 0,6$ P ≈ 0,43
	♀ D16 × ♂ D41		{ f } = 26 { fg } = 24 N = 50	$\chi_1^2 = 0,08$ P ≈ 0,77
	♀ D59 × ♂ D62		{ f } = 15 { fg } = 12 N = 27	$\chi_1^2 = 0,33$ P ≈ 0,60
	♀ D1 × ♂ D64		{ f } = 13 { fg } = 13 N = 26	$\chi_1^2 = 0$
	♀ D62 × ♂ D64		{ fg } = 33 { f } = 13 N = 46	$\chi_1^2 = 8,69$ P ≈ 0,003 rejet au seuil de 1 %
Zylogrammes	{ fg } × { fg }	{ f } { fg } { g }	1 2 1	
Génotypes correspondants	(Lap 2 <sub>f</sub> - Lap 2 <sub>g</sub> ) × (Lap 2 <sub>f</sub> - Lap 2 <sub>g</sub> )	(Lap 2 <sub>f</sub> ) <sup>2</sup> (Lap 2 <sub>f</sub> - Lap 2 <sub>g</sub> ) (Lap 2 <sub>g</sub> ) <sup>2</sup>		
	♀ D15 × ♂ D53		{ fg } = 23 { f } = 4 { g } = 8 N = 35	$\chi_3^2 = 4,3$ P ≈ 0,12
Zylogrammes	{ fg } × { fh }	{ f } { fg } { fh } { gh }	1 1 1 1	
Génotypes correspondants	(Lap 2 <sub>f</sub> - Lap 2 <sub>g</sub> ) (Lap 2 <sub>f</sub> - Lap 2 <sub>h</sub> )	(Lap 2 <sub>f</sub> ) <sup>2</sup> (Lap 2 <sub>f</sub> - Lap 2 <sub>g</sub> ) (Lap 2 <sub>f</sub> - Lap 2 <sub>h</sub> ) (Lap 2 <sub>g</sub> - Lap 2 <sub>h</sub> )		

♀ D15 × ♂ D17

{ f } = 12  
 { fg } = 11  
 { fh } = 4  
 { gh } = 3  
 N = 30

$\chi^2 = 8,11$   
 P = 0,04

$\Sigma \chi^2 = \chi^2_{11} = 23,66$   
 P = 0,02

NB<sub>1</sub> = N effectif étudié.

NB<sub>2</sub> = P est la probabilité, sous l'hypothèse nulle, de trouver une valeur de  $\chi^2$  supérieure à la valeur observée.

La descendance D62 × D64 est en contradiction avec les résultats homogènes obtenus pour 5 autres croisements de même type {fg} × {f}. Or, lors de l'étude de la zone 1 du système Lap, la descendance de ce croisement ne correspondait pas non plus aux ségrégations attendues. Des hypothèses génétiques telles que l'existence d'une trisomie ont été envisagées. Elles n'ont pas permis d'expliquer ces déviations. La lecture de la descendance d'un autre croisement sur un gel mal identifié par erreur pourrait simplement en être la cause.

La valeur élevée du  $\chi^2$  pour le croisement D15 × D17 peut être interprétée, étant donné le faible effectif, comme une déviation aléatoire.

c) Conclusion

Malgré les 2 descendance en contradiction avec l'hypothèse, il semble cependant raisonnable de considérer que la zone 2 correspond au fonctionnement d'un gène Lap 2 qui a au moins 3 formes alléliques Lap 2<sub>f</sub>, Lap 2<sub>g</sub> et Lap 2<sub>h</sub>.

d) Confirmation du déterminisme génétique du locus Lap 2 au niveau tétraploïde

Deux individus sur les 84 de l'échantillon présentent au locus Lap 2, 2 bandes homologues des bandes f et g trouvées chez les diploïdes. Ils ont, tous les deux, été notés {3f1g}, les autres plantes étant {4f}.

Le seul croisement {3f1g} × {4f} réalisé donne une descendance compatible avec l'hypothèse d'une fonction linéaire entre l'intensité d'une bande et le dosage allélique (tabl. 5).

De même que pour le locus Lap 1, ces résultats encourageants restent cependant à confirmer.

Des individus présentant trois bandes pour le locus Lap 2 ont été observés par De VIENNE (1978). Le matériel étudié alors était un mélange de grains de pollen germés issus d'une cinquantaine de fleurs d'un même individu. Les plantes, ayant un zymogramme à 3 bandes, seraient donc trigéniques.

C. Système  $\beta$ -amylase :  $\beta$ -amy

Les études génétiques faites sur le blé (NISHIKAWA *et al.*, 1971 ; CHEN, 1970) et sur le maïs montrent que les  $\alpha$ -amylases (EC.3.2.1.1) et les  $\beta$ -amylases (EC. 3.2.1.2) fonctionnent sous forme de monomères.

1. Analyse des individus diploïdes, hypothèse sur le déterminisme génétique

Une zone sur le gel a été choisie pour sa stabilité et sa répétibilité quels que soient les extraits. L'instabilité des autres bandes peut être due soit à des artefacts de manipulation, soit à des différences d'états physiologiques des plantes lors des divers prélèvements (fig. 3).

Compte tenu des résultats bibliographiques et du fait que les individus ne possèdent qu'une ou 2 bandes parmi les autres observées sur l'échantillon, l'hypothèse émise est l'existence de 4 allèles codominants  $\beta$ -Amy<sub>a</sub>,  $\beta$ -Amy<sub>b</sub>,  $\beta$ -Amy<sub>c</sub> et  $\beta$ -Amy<sub>d</sub> d'un même locus codant respectivement pour les unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  qui migrent au niveau des bandes a, b, c et d.

TABLEAU 5

Confirmation du déterminisme génétique du locus Lap 2 au niveau tétraploïde : descendance des croisements.  
 Confirmation of the genetic determination of the Lap 2 locus at the tetraploid level : offspring from the crosses.

Croisement réalisé	Descendance attendue	Descendance obtenue	Valeur du $\chi^2$ et de P
Zymogrammes	{ 4f } × { 3f 1g }	{ 4f } 1 { 3f 1g } 1 si $\alpha = 0$	
Génotypes correspondants	(Lap 2 <sub>f</sub> ) <sup>4</sup> × (Lap 2 <sub>f</sub> ) <sup>3</sup> (Lap 2 <sub>g</sub> )	(Lap 2 <sub>f</sub> ) <sup>4</sup> (Lap 2 <sub>f</sub> ) <sup>3</sup> (Lap 2 <sub>g</sub> )	
♀ T18 × ♂ T22		{ 4f } = 34 { 3f 1g } = 29 N = 63	Si $\alpha = 0$ $\chi^2 = 0,39$ P = 0,60

NB<sub>1</sub> : P est la probabilité de trouver une valeur de  $\chi^2$  supérieure à la valeur observée.

NB<sub>2</sub> : N est l'effectif étudié pour chaque croisement.

TABLEAU 6

*Recherche du déterminisme génétique du système «  $\beta$ -Amylase » : résultats des descendance des croisements entre diploïdes.*  
*Genetic determination of the «  $\beta$ -Amylase » system : results on the offspring of crosses between diploids.*

	Croisement réalisé	Descendance attendue	Descendance obtenue	Valeur du $\chi^2$ et de P
Zymogrammes	{ ab } $\times$ { b }	{ ab } { b }	1 1	
Génotypes correspondants	$(\beta\text{-Amy}_a - \beta\text{-Amy}_b)$ $\times (\beta\text{-Amy}_b)^2$	$(\beta\text{-Amy}_a - \beta\text{-Amy}_b)$ $(\beta\text{-Amy}_b)^2$		
	♀ D15 $\times$ ♂ D53		{ b } = 16 { ab } = 25 N = 41	$\chi^2_1 = 0,91$ P = 0,34
	♀ D15 $\times$ ♂ D17		{ b } = 19 { ab } = 13 N = 32	$\chi^2_1 = 1,12$ P = 0,30
	♀ D5 $\times$ ♂ D15		{ b } = 43 { ab } = 37 N = 80	$\chi^2_1 = 0,45$ P = 0,50
Zymogrammes	{ b } $\times$ { bc }	{ b } { bc }	1 1	
Génotypes correspondants	$(\beta\text{-Amy}_b)^2 \times$ $(\beta\text{-Amy}_b - \beta\text{-Amy}_c)$	$(\beta\text{-Amy}_b)^2$ $(\beta\text{-Amy}_b - \beta\text{-Amy}_c)$		
	♀ D39 $\times$ ♂ D34		{ b } = 14 { bc } = 17 N = 31	$\chi^2_1 = 0,29$ P = 0,60
	♀ D62 $\times$ ♂ D64		{ b } = 21 { bc } = 25 N = 46	$\chi^2_1 = 0,58$ P = 0,30
	♀ D34 $\times$ ♂ D36		{ b } = 12 { bc } = 13 N = 25	$\chi^2_1 = 0,04$ P = 0,85
Zymogrammes	{ ac } $\times$ { b }	{ ab } { bc }	1 1	
Génotypes correspondants	$(\beta\text{-Amy}_a - \beta\text{-Amy}_c)$ $\times (\beta\text{-Amy}_b)^2$	$(\beta\text{-Amy}_a - \beta\text{-Amy}_b)$ $(\beta\text{-Amy}_b - \beta\text{-Amy}_c)$		
	♀ D16 $\times$ ♂ D41		{ bc } = 32 { ab } = 24 N = 56	$\chi^2_1 = 1,14$ P = 0,30
Zymogrammes	{ b } $\times$ { b }	100 % { b }		
Génotypes correspondants	$(\beta\text{-Amy}_b)^2 \times$ $(\beta\text{-Amy}_b)^2$	$(\beta\text{-Amy}_b)^2$		
	♀ D1 $\times$ ♂ 64		{ b } = 26 N = 26	
Zymogrammes	{ ab } $\times$ { bc }	{ ab } 1 ; { b } 1 { ac } 1 ; { bc } 1		
Génotypes correspondants		$(\beta\text{-Amy}_a - \beta\text{-Amy}_b)$ $(\beta\text{-Amy}_b)^2$ $(\beta\text{-Amy}_a - \beta\text{-Amy}_c)$ $(\beta\text{-Amy}_b - \beta\text{-Amy}_c)$		

♀ D59 × ♂ D62	{ ab } = 7 { b } = 3 { ac } = 10 { bc } = 7 N = 27	χ <sub>3</sub> <sup>2</sup> = 3,66 P ≈ 0,30
---------------	--	--

$$\Sigma \chi^2 = \chi_{10}^2 = 8,19$$

$$P = 0,60$$

NB<sub>1</sub> : P est la probabilité de trouver une valeur de χ<sup>2</sup> supérieure à la valeur observée.  
NB<sub>2</sub> : N est l'effectif étudié pour chaque croisement.

Zymogrammes

```

c      : c      : c      : c      : c      : c      : c      : c      : c      : c      : c      : c
c      : b      : b      : b      : b      : b      : b      : b      : b      : b      : b
a      : a      : a      : a      : a      : a      : a      : a      : a      : a
d      : d      : d      : d      : d      : d      : d      : d      : d      : d
    
```

Génotypes correspondants

```

      :      :      :      : β-Amya : β-Amya : β-Amya : β-Amyb : β-Amyb : β-Amyc
(β-Amyd)2 : (β-Amyb)2 : (β-Amyc)2 : (β-Amyd)2 :
      :      :      :      : β-Amyb : β-Amyc : β-Amyd : β-Amyc : β-Amyd : β-Amyd
    
```

Effectif observé

0 : 48 : 0 : 0 : 11 : 1 : 0 : 4 : 1 : 0

Effectif N = 65

Figure 3  
Système « β AMYLASE ».  
" β AMYLASE " system.

2. Test de l'hypothèse : analyse des descendance de croisements choisis

Les résultats sont inscrits dans le tableau 6. Ils sont cohérents avec l'hypothèse pour les bandes a, b, c. La somme des χ<sup>2</sup> est un χ<sup>2</sup> à 10 ddl de valeur 8,19. La probabilité de trouver une valeur supérieure sous l'hypothèse nulle est de l'ordre de 0,60. Etant donné la répétabilité et la localisation de la bande d sur le gel, on considérera qu'elle correspond au produit d'un allèle β-Amy<sub>d</sub>. Cette hypothèse n'a pas encore pu être testée.

3. Conclusion

L'hypothèse de l'existence d'un contrôle génétique par un locus à 4 allèles codominants du système β-amylase est retenue.

4. Confirmation, au niveau tétraploïde du déterminisme génétique du locus β-Amy

Bien que 4 allèles soient présents dans la population, aucun individu n'est tétragénique. Cependant plusieurs sont trigéniques.

De même que pour les locus Lap 1 ou Lap 2, les bandes ont été notées selon leurs intensités. Quelques individus choisis pour leurs zymogrammes, ont été croisés et leurs descendance analysées (tabl. 7).

La descendance du croisement T18 × T22 soit { 2a2b } × { 2a2b }, d'effectif assez important, semble correspondre aux proportions attendues pour les autotétraploïdes (1.8.18.8.1).

Par ailleurs, l'analyse d'une dizaine de populations naturelles de *Medicago sativa* d'origines diverses (France, Turquie, Tunisie, U.R.S.S., Chine) ont révélé une dizaine de bandes électrophorétiques correspondant probablement à des allèles différents (DE DENYS & LEMAIRE, 1980).

D. Le système phosphatases acides : PA

Diverses hypothèses ont été faites pour la zone correspondant aux bandes électrophorétiques les plus rapides des phosphatases acides. Mais elles n'étaient pas compatibles avec les résultats des croisements effectués. De plus, la technique de révélation utilisée est fastidieuse et de nombreuses précautions sont nécessaires pour obtenir une bonne répétabilité. Enfin la conservation au froid ne semble pas une méthode très favorable puisqu'après une quinzaine de jours les résultats ne sont plus reproductibles. KRASNUCK *et al.* (1976) ont constaté le même phénomène sur la luzerne : une conservation des extraits au froid pendant une période supérieure à 5 j altère les résultats.

Ce système enzymatique a été abandonné provisoirement. Une étude plus approfondie, notamment une mise au point du mode de conservation des extraits, est nécessaire.

E. Liaison entre les locus

En utilisant les descendance des croisements choisis pour étudier le déterminisme génétique des bandes électrophorétiques, il est possible de tester l'indépendance ou la liaison entre les locus. Cependant les effectifs sont souvent faibles et le type de croisement permettant de lire directement les 4 produits de la méiose, c'est-à-dire le couple réalisé par un parent hétérozygote et un parent homozygote, n'existe pas toujours.

Des valeurs élevées de χ<sup>2</sup> suggèrent une liaison entre les locus Lap 1 et Lap 2. Sa valeur estimée par la méthode du maximum de vraisemblance serait de l'ordre de 25 centimorgan.

Le locus β-Amy semble indépendant de Lap 1 et Lap 2. La liaison entre le locus Got et les autres n'a pu être étudiée car il n'existait qu'une seule descendance issue de l'individu

TABLEAU 7

Confirmation du déterminisme génétique du locus  $\beta$ -Amy au niveau tétraploïde : descendance des croisements.  
Confirmation of the genetic determination of the  $\beta$ -Amy locus at the tetraploid level : offspring from the crosses.

	Croisement réalisé	Descendance attendue	Descendance obtenue	Valeur du $\chi^2$ et de P
Zymogrammes	{ 2a 2b } $\times$ { 2a ab }	{ 4a } { 3a 1b } { 2a 2b } { 1a 3b } { 4b } si $\alpha = 0$	1 8 18 8 1	
Génotypes correspondants		( $\beta$ -Amy) <sup>4</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) <sup>3</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) ( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) <sup>2</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) <sup>2</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) ( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) <sup>3</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) <sup>4</sup>		
	♀ T18 $\times$ ♂ T22		{ 4a } = 0 { 3a 1b } = 24 { 2a 2b } = 60 { 1a 3b } = 21 { 4b } = 7 N = 112	Si $\alpha = 0$ $\chi^2_4 = 8,8$ P = 0,10
	♀ T2 $\times$ ♂ T7		{ 4a } = 1 { 3a 1b } = 4 { 2a 2b } = 19 { 1a 3b } = 2 { 4b } = 0 N = 26	Les effectifs sont trop faibles pour utiliser le test $\chi^2$
Zymogrammes	{ 4b } $\times$ { 4a }	100 % { 2a 2b }		
Génotypes correspondants	( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) <sup>4</sup> $\times$ ( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) <sup>4</sup>	100 % ( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) <sup>2</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) <sup>2</sup>		
	♀ T23 $\times$ ♂ T28		{ 2a 2b } = 11 N = 11	
Zymogrammes	{ 1a 3b } $\times$ { 2a 2b }	{ 4b } 1 { 2a 2b } 5 { 3a 1a } 5 { 1b 3a } 1 si $\alpha = 0$		
Génotypes correspondants	( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) ( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) <sup>3</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) <sup>2</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) <sup>2</sup>	( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) <sup>4</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) <sup>2</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) <sup>2</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) <sup>3</sup> ( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) ( $\beta$ -Amy <sub>b</sub> ) ( $\beta$ -Amy <sub>a</sub> ) <sup>3</sup> si $\alpha = 0$		
	♀ T60 $\times$ ♂ T18		{ 4b } = 1 { 2a 2b } = 4 { 3a 1b } = 7 { 1a 3b } = 0 N = 12	Les effectifs étant trop faibles, il est impossible d'utiliser le test $\chi^2$

NB<sub>1</sub> : N = effectif étudié.

NB<sub>2</sub> : P est la probabilité, sous l'hypothèse nulle, de trouver une valeur de  $\chi^2$  supérieure à la valeur observée.

hétérozygote Got<sub>a</sub>-Got<sub>b</sub> et elle ne comprenait que 15 individus.

#### F. Comparaison des populations di- et tétraploïdes

Les résultats des deux études permettent une première comparaison de 2 populations de *Medicago sativa* à 2 niveaux de ploïdie différents. Toutefois les effectifs des échan-

tillons étudiés sont faibles et les conclusions sont à prendre avec réserve.

Une fréquence allélique a été estimée pour chaque locus d'après le génotype des individus (tabl. 8). Il subsiste toutefois une incertitude pour le locus Lap liée à la présence de l'allèle Lap 1<sub>nu1</sub> dans la population. Les bandes migrant au même niveau sur le gel chez des individus de niveau de

TABLEAU 8  
 Comparaison des fréquences alléliques dans les populations diploïdes et tétraploïdes.  
 Comparison of allelic frequencies in the diploid and tetraploid populations.

Locus	Population diploïde			Population tétraploïde		
	Fréquences alléliques	Ecart type	Effectif	Fréquences alléliques	Ecart type	Effectif
Got	f(Got <sub>a</sub> ) = 0,02 f(Got <sub>b</sub> ) = 0,98	0,017 0,017	N = 66	f(Got <sub>b</sub> ) = 1		N = 62
Lap	f(Lap 1 <sub>a</sub> ) = 0,32 f(Lap 1 <sub>b</sub> ) = 0,60 f(Lap 1 <sub>c</sub> ) = 0,06 f(Lap 1 <sub>nu</sub> ) = 0,02	0,06 0,06 0,03 0,02	N = 59	f(Lap 1 <sub>a</sub> ) = 0,04 f(Lap 1 <sub>b</sub> ) = 0,88 f(Lap 1 <sub>c</sub> ) = 0,08	0,02 0,04 0,03	N = 59
Lap	f(Lap 2 <sub>r</sub> ) = 0,67 f(Lap 2 <sub>g</sub> ) = 0,30 f(Lap 2 <sub>n</sub> ) = 0,03	0,06 0,06 0,02	N = 58	f(Lap 2 <sub>r</sub> ) = 0,99 f(Lap 2 <sub>g</sub> ) = 0,01	0,01 0,01	N = 55
β-Amy	f(β-Amy <sub>a</sub> ) = 0,1 f(β-Amy <sub>b</sub> ) = 0,85 f(β-Amy <sub>c</sub> ) = 0,04 f(β-Amy <sub>d</sub> ) = 0,01	0,03 0,04 0,02 0,01	N = 65	f(β-Amy <sub>a</sub> ) = 0,33 f(β-Amy <sub>b</sub> ) = 0,59 f(β-Amy <sub>c</sub> ) = 0,07 f(β-Amy <sub>d</sub> ) = 0,01	0,05 0,06 0,03 0,01	N = 64

N.B. : f(Got<sub>b</sub>)<sub>2n</sub> et f(Got<sub>b</sub>)<sub>4n</sub> ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %.  
 f(Lap 1<sub>b</sub>)<sub>2n</sub> et f(Lap 1<sub>b</sub>)<sub>4n</sub> } sont significativement différentes au seuil de 5 %.  
 f(Lap 2<sub>r</sub>)<sub>2n</sub> et f(Lap 2<sub>r</sub>)<sub>4n</sub> }  
 f(β-Amy<sub>b</sub>)<sub>2n</sub> et f(β-Amy<sub>b</sub>)<sub>4n</sub> }

pléidie différent sont supposées correspondre au même allèle ou du moins à une même classe allélique.

La richesse allélique aux locus Got et Lap 2 est plus faible pour l'échantillon tétraploïde. Par ailleurs, pour chacun des autres locus considérés, il existe un allèle dont la fréquence est supérieure à 0,5 et qui est le même aux deux niveaux de pléidie. Les autres allèles ont des fréquences bien plus faibles. Les différences de fréquences entre les allèles prépondérants ne vont pas dans le même sens si on passe d'un niveau de pléidie à l'autre : pour le locus β-Amy on constate une diminution de la fréquence de l'allèle β-Amy<sub>b</sub> lorsque le niveau de pléidie augmente mais le phénomène contraire est observé pour le locus Got, Lap 1 et Lap 2.

Pour les 4 locus et les 2 niveaux de pléidie, on a recherché si la structure génotypique était en accord avec une structure panmictique. Cependant étant donné les faibles effectifs, il est souvent impossible d'utiliser le test χ<sup>2</sup> même après avoir regroupé des classes génotypiques. Pour les 2 échantillons étudiés et pour les 4 locus enzymatiques, aucun résultat surprenant n'a été observé : les répartitions génotypiques sont compatibles avec la panmixie. Ceci, allié au fait qu'il existe à chaque locus une forme allélique prépondérante, permet d'expliquer le faible nombre d'individus trigéniques et tétragéniques dans la population tétraploïde bien que 3 ou 4 allèles existent pour certains locus. Il faut souligner le fait que les plantes cultivées en serre n'étaient pas en condition de compétition et qu'elles n'ont donc subi aucune sélection qui aurait éventuellement favorisé l'hétérozygotie.

Seules les fréquences des génotypes mono- et hétérogéniques peuvent être comparées sur les échantillons diploïdes et tétraploïdes (tabl. 9). Quel que soit le niveau de pléidie, la moyenne des fréquences des génotypes monogéniques sur les 4 locus étudiés est pratiquement de même valeur.

La notion d'hétérozygotie, définie chez les diploïdes comme la moyenne des fréquences des hétérozygotes sur un nombre n de locus structuraux, a un intérêt limité chez les

TABLEAU 9

Comparaison des fréquences des génotypes monogéniques et hétérogéniques selon le niveau de pléidie.  
 Comparison of monogenic and heterogenic genotype frequencies at different ploidy levels.

Locus	Echantillon diploïde	Echantillon tétraploïde
Got	Ho : 98,5 % He : 1,5 %	Ho : 100 % He : 0 %
Lap 1	Ho : 46 % He : 54 %	Ho : 75 % He : 25 %
Lap 2	Ho : 50 % He : 50 %	Ho : 97 % He : 3 %
β-Amy	Ho : 74 % He : 26 %	Ho : 16 % He : 84 %
	$\overline{H_{o_{2n}}} = 67,2 \%$ $\overline{H_{c_{2n}}} = 32,8 \%$	$\overline{H_{o_{4n}}} = 62,7 \%$ $\overline{H_{c_{4n}}} = 37,3 \%$

N.B. : H<sub>o</sub> représente les génotypes monogéniques.  
 H<sub>c</sub> représente les génotypes hétérogéniques.

autotétraploïdes. En effet, cette notion ne permet pas de prendre en considération les différentes formes d'hétérozygotie possibles (digénie, trigénie et tétragénie). Les indices classiques de la génétique des populations semblent donc inadaptés pour décrire le matériel polyploïde qui représente pourtant au moins 30 p. 100 des espèces végétales. Ce type d'analyse par électrophorèse montre la nécessité de concevoir des indices plus généraux et mieux adaptés pour suivre et comparer l'évolution des structures génotypiques des populations.

Les présents résultats sur la structure génotypique des populations sont certes limités puisque le principal but de

TABLEAU 10

Répartition des différents génotypes rencontrés dans l'échantillon de la population tétraploïde.  
Genotype distribution in the tetraploid population.

Monogénique aux 4 locus	Monogénique à 3 locus digénique à 1 locus	Monogénique à 2 locus digénique à 2 locus	Monogénique à 1 locus digénique à 3 locus	Monogénique à 2 locus digénique à 1 locus trigénique à 1 locus	Monogénique à 3 locus trigénique à 1 locus	Monogénique à 1 locus digénique à 2 locus trigénique à 1 locus
6	34	9	1	2	2	1

travail : élucider le déterminisme génétique de quelques locus, était inconciliable avec l'analyse d'un très grand nombre d'individus de chaque population. Il est néanmoins assez surprenant de trouver un tel nombre d'individus tétraploïdes à l'état monogénique ou digénique (tabl. 10). L'autotétraploïdie est en effet considérée comme une possibilité de réservoir allélique conférant à court terme aux individus une meilleure homéostasie et à long terme à la population de vastes possibilités d'évolution. La baisse des fréquences d'interactions d'ordre élevé (tétramincance, trimincance) est une des hypothèses retenues pour expliquer la chute de vigueur considérable constatée chez les espèces autotétraploïdes allogames au cours des générations d'autofécondations. Cependant, il faut garder en mémoire que l'électrophorèse ne permet pas de révéler toute la variabilité génétique existante.

#### IV. CONCLUSION

- Les techniques d'approche du génome, telle que l'électrophorèse, feront sans aucun doute, progresser la théorie de la génétique des polyploïdes et permettront de mieux comprendre l'intérêt de la structure autotétraploïde dans le phénomène de spéciation. Il deviendra notamment possible de comparer les structures génotypiques mises en place selon le degré de ploïdie, le mode de reproduction et la pérennité dans les populations et les espèces différentes composant le genre *Medicago*, à condition d'augmenter le nombre de marqueurs.

- Notamment le paramètre  $\alpha$  égal à la probabilité de formation d'un gamète possédant 2 allèles frères donc homozygote pourra être estimé par l'étude électrophorétique de la descendance de certains croisements bien choisis. On peut, en effet se demander si  $\alpha$  est constant dans les diverses populations et si l'espèce ne possède pas ainsi un moyen de moduler son taux d'homozygotie selon le milieu.

- Les mécanismes de régulation et la comparaison de divers degrés de ploïdie pourraient être analysés, par l'étude de la mise en place des systèmes enzymatiques sur des couples de plantes isogéniques et sur différents organes (feuilles-pollen).

- Enfin lors de la sélection de cette espèce, ces marqueurs peuvent être utilisés pour suivre l'évolution des fréquences génotypiques des populations en sélection et notamment des structures parentales lors de la création des variétés synthétiques. Cette technique permet aussi une estimation des taux d'autofécondation ainsi qu'une meilleure connaissance des mécanismes de sélection gamétique ou zygotique par l'étude des générations successives.

Reçu le 2 février 1981.  
Accepté le 17 octobre 1981.

#### REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement Madame DATTÉE, Maître Assistante à l'E.N.S. rue d'Ulm, qui a longuement discuté ce travail.

#### ANNEXE

##### Glutamate-Oxaloacétate-Transaminase : Got

Electrophorèse à 240 V pendant 2 bleus 1/2

Gel mis dans une solution filtrée contenant :

— 200 mg a. aspartique

— 10 mg pyridoxal 5 Phosphate

— 20 mg a.  $\alpha$  cétoglutarique + 25 mg. Fast blue BB Salt dans 50 ml de tampon Tris HCl 0,5 M pH = 8,3

Incubation 2 h à 37 °C à l'obscurité.

##### Leucine Amino-Peptidase : Lap

Electrophorèse à 160 V pendant 2 bleus 1/4

Gel mis dans une solution contenant :

— L Leucyl-4-métoxy  $\beta$ -Naphthylamide : 24 mg dissous avec quelques gouttes de méthanol dans 3 ml H<sub>2</sub>O.

— NaCl 0,14 M : 24 ml

— KCN 0,02 M : 3 ml

— Fast Blue B Salt : 30 mg dans 30 ml de tampon acétate de Na 0,1 M pH 6,5.

Incubation 2 h à 37 °C à l'obscurité.

Rincer avec NaCl 0,14 M.

Immerger dans CuSO<sub>4</sub> 0,1 M.

Rincer de nouveau avec NaCl 0,14 M.

**$\beta$  Amylase**

Electrophorèse à 160 V pendant 1 h puis à 240 V pendant 2 h.

Gel mis dans solution contenant 2 p. 100 d'amidon dissous en chauffant jusqu'à éclaircissement dans tampon acétate Na pH = 4,5 puis ramener à 37 °C.

Incubation 1/2 h à 37 °C à l'obscurité.

Bien laver les gels à l'eau (3 fois).

Placer les gels dans une solution d'eau iodo-iodurée (3 g I<sub>2</sub> + 30 g I<sub>k</sub>, Q<sub>s</sub> = 1 l).

**Phosphatases acides**

Electrophorèse à 240 V pendant 2 bleus.

Gel mis à préincuber dans une solution tampon acétate de Na pH 5 0,1 M à 0°C.

Changer 2 fois la solution tous les 1/4 d'heure.

Gel mis dans la solution de révélation n° 3.

**Solution n° 1 :**

Mélanger Fuchsine basique 4 p. 100 dans HCl 2 N (800 mg dans 16 ml H<sub>2</sub>O + 2 ml HCl)  
NaNO<sub>2</sub> 4 p. 100 dans H<sub>2</sub>O (800 mg dans 20 ml H<sub>2</sub>O)

**Solution n° 2 :**

Mélanger acide  $\alpha$  naphthyl phosphate 0,11 p. 100 (400 mg)  
100 ml de tampon veronal  
260 ml de H<sub>2</sub>O

Tampon véronal = Acétate Na 1,94 p. 100  
+ barbital Na 2,94 p. 100

**Solution n° 3 :**

Mélanger 32 ml de la solution 1  
360 ml de la solution 2

Le pH de la solution n° 3 est amené à pH 3,5 avec HCl. L'incubation a lieu à température ambiante, à l'obscurité pendant 2-3 h.

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Bonnet-Masimbert M., Bikay-Bikay V., 1978.** Variabilité intraspécifique des isoenzymes de la glutamate-oxaloacétate-transaminase chez *Pinus nigra* A., intérêt pour la taxonomie des sous-espèces. *Silvae Genet.*, **27** (2), 49-84.
- Brunel D., 1979.** Recherche du déterminisme génétique de quelques systèmes enzymatiques chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) di- et tétraploïde. Thèse de 3<sup>e</sup> Cycle. Université Paris XI, Orsay.
- Chen S. L., 1970.** Amylase isozymes in *Xanthium* leaves. *Physiol. Plant.*, **23**, 434-443.
- Ciferri O., Sora S., Tiboni O., 1969.** Effect of gene dosage on tryptophan synthetase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **61**, 567-576.
- Deloss Ford J., 1973.** Identification of alfalfa genotypes by electrophoresis of soluble proteins and selected enzymes. *Diss. Abstr. Internation. Sect. B*, **34** (3), 958.
- Demarly Y., 1963.** Génétique des tétraploïdes et amélioration des plantes. *Ann. Amélior. Plant.*, **13** (4), 307-400.
- Denys (de) S., Lemaire M., 1980.** Recherche de marqueurs enzymatiques et comparaison de la variabilité génétique de quelques populations du genre *Medicago*. Stages : D.E.A. de génétique quantitative Paris VII - D.E.A. d'Amélioration des Plantes, Paris XI.
- Farber R. A., 1973.** Gene dosage and the expression of electrophoretic patterns in heteroploid mouse cell lines. *Genetics*, **74**, 521-531.
- Gillies C. B., 1972.** Alfalfa chromosomes 1 et 11. *Crop Sci.*, **10**, 169-175.
- Gottlieb L. D., 1973.** Genetic control of glutamate oxaloacetate transaminases du dactyle (*Dactylis glomerata* L.): génétique formelle d'un locus. *C.R. Acad. Sci.*, Sér. D., **287**, 705-708.
- Hart G. E., 1975.** Glutamate-oxaloacetate-transaminase isozymes of *Triticum*: evidence for multiple systems of triplicate structural genes in hexaploid wheat. In *Isozymes III. Developmental Biology* (ed. MARKET) 637-657 Academic Press, New York.
- Hart G. E., McMillin D. E., Sears E. R., 1976.** Determination of chromosomal localisation of a glutamate oxaloacetate-transaminase structural gene using *Triticum-Agropyron* translocations. *Genetics*, **83**, 49-61.
- Hart G. E., Langston P. J., 1977.** Glutamate-oxaloacetate-transaminase isozymes of the *Triticinae*: Dissociation and recombination of subunits. *Theor. appl. Genet.*, **50**, 47-51.
- Krasnuk M., Witham F. H., Jung G. A., 1976.** Electrophoretic studies of several hydrolytic enzymes in relation to the cold tolerance of alfalfa. *Cryobiology*, **13**, 225-242.
- Lumaret R., Valdeyron G., 1978.** Les glutamates oxaloacétate-transaminases du dactyle (*Dactylis glomerata* L.) génétique formelle d'un locus. *C.R. Acad. Sci.*, Sér. D., **287**, 705-708.
- Lundkvist K., 1974.** Inheritance of leucine aminopeptidase isozymes in *Picea abies* K. *Hereditas*, **76**, 91-96.
- McDonald T., Brewbaker J. L., 1972.** Isoenzyme polymorphism in flowering plants. VIII Genetic control and dimeric nature of transaminase hybrid maize isoenzymes. *J. Hered.*, **63**, 11-14.
- Mariani A., 1978.** Cytological and electrophoretic patterns of seed proteins in *Medicago sativa*, *Medicago glutinosa* and their hybrids. *Genet. agrar.*, **32** (1/2), 21-39.
- Nielsen G., 1980.** Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (*Lolium* spp.), segregating for 4 alleles in PG I enzymes locus. *Hereditas*, **92** (1), 49-52.
- Nishikawa K., 1971.** Determinism of  $\alpha$  amylase isozymes in wheat. *Jpn. J. Genet.*, **46**, 345-353.
- Peacock A. C., Dingman C. W., 1967.** Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, **6**, 1818-1827.
- Przybylska J., Hurich J., 1971a.** The use of basic and acid gel systems in disc electrophoretic studies of seed proteins of some *Medicago* species. *Bull. Acad. Polon. Sci. Sect. Sci. Biol.*, **19**, 31-36.
- Przybylska J., Hurich J., 1971b.** Disc electrophoretic study of seed proteins of various *Medicago* species, *Melilotus albus*, *Trifolium pratense*, *T. repens*. *Acta Soc. bot. pol.*, **40**, 681-695.
- Quiros C. F., 1979.** Allozyme variation and genetics in cultivated alfalfa and closely related diploid species. *Can. J. Genet. Cytol.*, **1979**, 4, 577.



- Quiros C. F.**, 1980. Identification of alfalfa plants by enzyme electrophoresis. *Crop Sci.*, **20**, 262-264.
- Rudin D.**, 1977. Leucine-amino-peptidase from needles and macrogametophytes of *Pinus sylvestris* L. Inheritance of allozymes. *Hereditas*, **85**, 219-226.
- Scandalios J. G.**, 1966. Amylase isozyme polymorphism in maize. *Planta*, **69**, 244-248.
- Scandalios J. G.**, 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. A review. *Biochem. Genet.*, **3**, 37-39.
- Scandalios J. G., Campeau M. A.**, 1972. Mutant amino-peptidases in *Pisum*. II. Nuclear gene control of a mitochondrial isozyme. *Mutation Res.*, **14** (1072), 397-403.
- Scandalios J. G., Espiritu L. G.**, 1969. Mutant amino-peptidases of *Pisum sativum*. I. Developmental genetics and chemical characteristics. *Mol. gen. Genet.*, **105**, 101-112.
- Scandalios J. G., Sorenso J. C., Ott L. A.**, 1975. Genetic control and intracellular localization of glutamate oxaloacetic transaminase in maize. *Biochem. Genet.*, **13**, n<sup>os</sup> 11 et 12.
- Tang K. S., Hart G. E.**, 1975. Use of isozymes as chromosomes markers in wheat-rye addition lines in triticale. *Genet. Res.*, **26**, 187-201.
- Vienne (de) D.**, 1978. Variabilité chez une espèce tétraploïde : analyse isoenzymatique et biométrique du pollen de quelques familles apparentées de luzerne. *Ann. Amélior. Plant.*, **28** (3), 289-307.
- Vrijenhoek R. C.**, 1975. Gene dosage in diploid and triploid unisexual fishes (*Poeciliopsis*, *Poeciliidae*). In *Isozymes*, vol. 4. *Genetics and Evolution*. MARKERT C. (Ed.). Academic Press, New York.