



HAL
open science

Méthodes biochimiques de caractérisation variétale des arbres forestiers

Michel Arbez

► **To cite this version:**

Michel Arbez. Méthodes biochimiques de caractérisation variétale des arbres forestiers. Revue forestière française, 1988, 40 (Spécial), pp.71-76. <10.4267/2042/25937>. <hal-03424696>

HAL Id: hal-03424696

<https://hal.science/hal-03424696v1>

Submitted on 10 Nov 2021

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.



HAL Authorization

MÉTHODES BIOCHIMIQUES DE CARACTÉRISATION VARIÉTALE DES ARBRES FORESTIERS

M. ARBEZ

ÉVOLUTION DES CRITÈRES DE CARACTÉRISATION VARIÉTALE

Morphologie, anatomie et dimensions d'organes de références

Les différences de morphologie et d'anatomie des organes reproducteurs surtout, les caractéristiques des feuilles, des bourgeons, des rameaux et des troncs (écorces) ensuite, sont utilisées pour distinguer les espèces forestières entre elles. Des différences, qualitative (présence ou absence d'un caractère, forme ou couleur d'un organe) ou quantitative (dimension ou nombre d'organes), généralement de moindre importance, peuvent être mises à profit pour distinguer des races ou des individus d'une même espèce. Si l'on connaît de nombreux exemples d'utilisation taxinomique de ces caractères, ils valent pour telle race ou tel clone particulier (forme ornementale notamment) mais leur pouvoir de discrimination n'est ni général ni précoce.

Les caractères dimensionnels passant pour contrôlés par un grand nombre de gènes, ils sont très modifiés par l'âge et les conditions du milieu. Leur utilisation à des fins taxinomiques n'est guère commode, elle nécessite un échantillonnage important et rigoureusement organisé et l'utilisation systématique de méthodes d'analyse multivariées. Les discriminations obtenues sont souvent imprécises, difficilement reproductibles et donc discutables. On en est donc progressivement venu à leur préférer des caractères biochimiques, plus difficiles à révéler, mais plus rigoureux et devenus plus accessibles du fait des progrès rapides des sciences (biochimie, génétique) et des techniques (électrophorèse, chromatographie notamment).

Marqueurs biochimiques

Un marqueur biochimique est un produit original du métabolisme de la plante. Il peut caractériser un état physiologique particulier (juvénilité, maturité sexuelle, sénescence, réactions à des agressions physiques ou biotiques : stress, maladies ou attaques d'insectes), on parle de

marqueur physiologique. Il peut aussi constituer la signature biochimique permettant d'identifier sans erreur possible un individu ou une population (race, écotype), on parle alors de marqueur génétique.

OBJECTIFS DES MÉTHODES DE CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE DES ARBRES FORESTIERS

Les produits métaboliques utilisés comme marqueurs génétiques sont généralement synthétisés sous contrôle oligogénique, ou mieux sous contrôle monogénique (sous le contrôle de deux allèles ou plus situés au même emplacement chromosomique ou locus). Leur expression est peu affectée par l'environnement. Une expression précoce permettant une discrimination très juvénile (graine ou plantule) représente un avantage certain. Pour rendre plus rigoureuses les discriminations entre populations, on s'efforce de recourir à des gènes présents ou absents, plutôt que variables en fréquence de manière continue suivant les populations.

NATURE DES MARQUEURS GÉNÉTIQUES LES PLUS COMMUNÉMENT UTILISÉS

Dans l'état actuel de nos connaissances, et sans vouloir être exhaustif, les marqueurs génétiques les plus communément utilisés sont de nature protéique ou enzymatique, de nature terpénique ou plus rarement phénolique. Chez les arbres forestiers, les méthodes faisant directement appel à la structure de l'ADN pour la reconnaissance des génotypes (sondes moléculaires, polymorphisme des fragments de restriction) restent encore purement prospectives.

L'étude par électrophorèse de la variabilité des protéines totales ou des isoenzymes constitue sans doute la méthode de marquage génétique la plus fréquemment utilisée. S'agissant des isoenzymes (ou isozymes), deux définitions ont été données qu'il convient de rappeler : selon Markert et Moller (1959), ce sont des « *formes moléculaires distinctes d'enzymes ayant une activité catalytique identique ou similaire* » ; selon l'Union internationale des Biochimistes, ce sont des « *formes multiples d'enzymes ayant entre elles des différences déterminées génétiquement dans leur structure primaire* » (IUB, 1971). En électrophorèse unidimensionnelle sur gel, on caractérise chaque individu par la constitution génétique au locus qui code pour une enzyme donnée, d'après le nombre et la position des bandes de migration sur le gel.

Les terpènes sont des carbures aromatiques (mono- ou polycycliques) présents notamment dans les résines des tissus corticaux, des aiguilles ou des bourgeons des conifères. Ils sont étudiés par chromatographie en phase gazeuse.

Les composés phénoliques (flavonoïdes notamment) sont utilisés moins fréquemment. Contrairement aux isozymes et aux monoterpènes, dont l'hérédité mendélienne simple a déjà été démontrée chez de nombreuses espèces, celle des composés phénoliques a rarement été étudiée.

PROBLÉMATIQUE DU TEST VARIÉTAL

L'identification des clones et celle des populations (provenances, variétés synthétiques issues des vergers à graines) correspondent à des problèmes différents.

Au plan théorique, la caractérisation d'un clone est un problème simple ; en multipliant le nombre de systèmes biochimiques analysés (systèmes enzymatiques, terpènes...), on a toute chance de mettre en évidence une ou des différences entre clones sur certains des systèmes utilisés.

Pour que deux individus appartiennent à des clones différents, il suffit (mais ce n'est pas nécessaire) que leurs profils biochimiques soient différents.

En effet, surtout si le nombre de systèmes analysés est faible, on peut imaginer que les individus aient des profils identiques pour les systèmes analysés, mais présentent des différences pour d'autres systèmes non étudiés.

On rencontre là un premier problème d'échantillonnage concernant le nombre de gènes considérés relativement à la totalité du génome étudié.

En utilisant cinq systèmes enzymatiques (MDH, 6 PGDH, EST, LAP et GOT), Bergmann (1986) a montré qu'il était cependant possible de caractériser 18 des 20 clones de Tremble (*Populus tremula*) constituant la variété multiclonale allemande « Ahle ».

L'identification des populations (provenances récoltées en forêt, variétés synthétiques produites en verger à graines) est plus problématique. La différence de fréquence allélique de 2 échantillons n'entraîne pas nécessairement que les 2 échantillons en question ne soient pas issus de la même population. Le fait d'échantillonner représente inévitablement la sur-représentation de certains allèles et la sous-représentation de certains autres. Par ailleurs, les fréquences alléliques moyennes des populations ne sont pas connues précisément, et elles peuvent fluctuer suivant l'année de fructification.

Quand l'échantillonnage sérieux d'une population utilisée comme témoin n'a pas révélé la présence d'un allèle mis en évidence dans une population inconnue, on peut affirmer sans grand risque de se tromper que cette dernière n'est pas identifiable au témoin. C'est ce que Bergmann (1986) appelle le principe d'exclusion.

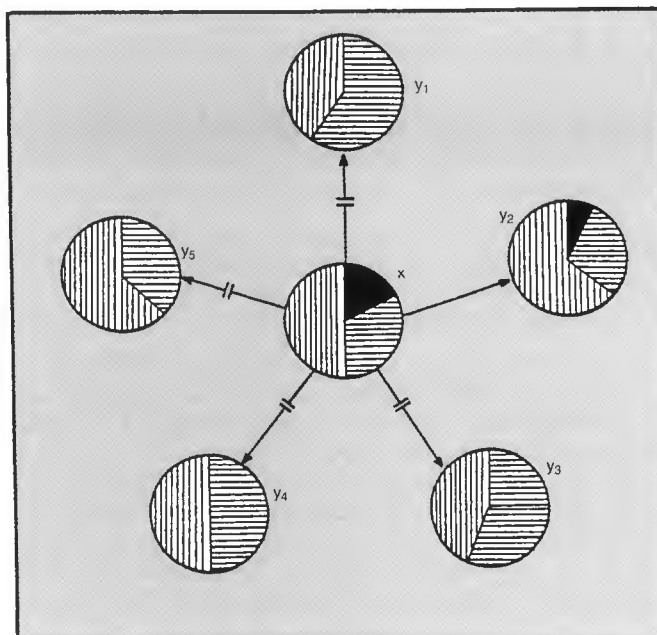


ILLUSTRATION DU PRINCIPE D'EXCLUSION (d'après Bergmann, 1986)

Les fréquences alléliques sont représentées par des secteurs de cercle.

Si un lot de graines x à identifier possède un allèle non présent dans la population de référence y_i ($i = 1, 3, 4, 5$), il faut exclure la possibilité pour x d'appartenir à y_i .

Par contre, le lot x peut provenir de y_2 , mais il n'y a véritablement identification que si cette possibilité est unique.

En d'autres termes, la faisabilité de l'identification de populations nécessite de disposer de marqueurs très variables entre populations (sur les provenances de l'ensemble de l'aire de répartition d'une espèce par exemple, ou sur l'ensemble des provenances introduites d'une espèce exotique) et de disposer d'une collection très complète, presque exhaustive, des témoins de l'espèce pour les systèmes marqueurs considérés.

Suivant l'espèce, c'est une catégorie de marqueur ou une autre qui se révélera suffisamment polymorphe au niveau inter-populations pour permettre la discrimination.

S'agissant des isozymes et de l'électrophorèse unidimensionnelle, la littérature fournit des exemples contradictoires suivant l'espèce, la nature des systèmes et des populations étudiées. Certaines études concluent en effet à la faisabilité de la discrimination inter-populations, d'autres constatent des différences de fréquence allélique trop faibles entre populations pour y parvenir.

S'agissant d'un nombre raisonnable d'isozymes, guère plus de 5 à 10 systèmes dans la plupart des cas, la majorité des revues d'articles sur le sujet s'accorde à reconnaître la difficulté du problème. L'une des plus récentes, faite par Rudin en 1986, constate que plus de 90 % des variations de fréquence allélique sont observées au niveau individuel intra-peuplement, et seulement 2 à 10 % résultent de différences inter-peuplement. Cette conclusion concerne principalement les difficultés de discrimination entre populations naturelles géographiquement différentes d'une même espèce, surtout s'agissant de peuplements voisins soumis à l'action unificatrice de migrations polliniques importantes.

La majorité des systèmes enzymatiques utilisés pour le marquage génétique et l'identification variétale est généralement considérée comme neutre vis-à-vis des pressions de sélection du milieu. Ces systèmes sont par contre très sensibles aux effets de dérive génétique, liés à l'histoire des populations : effets de fondation ou plus généralement passage par des phases de petites populations. Pour être complet, citons tout de même quelques exemples concernant des variations de fréquence allélique avec la latitude, l'altitude ou même la pollution atmosphérique.

Rien d'étonnant, par conséquent, à ce que les distances entre populations mesurées à partir de caractères isoenzymatiques et celles impliquant des caractères forestiers (croissance, adaptation, morphologie) coïncident rarement. Les différences mesurées dans les deux cas expriment l'action de facteurs de nature différente et les informations fournies sont complémentaires. On rencontre cependant quelques exceptions : récemment A. Kremer et B. Jung, travaillant sur 6 populations françaises introduites de Chêne rouge d'Amérique, viennent de mettre en évidence une étroite coïncidence entre distances mesurées en utilisant 4 systèmes isoenzymatiques et distances fondées sur le polymorphisme foliaire ($r = 0,88$).

La seconde difficulté rencontrée en matière d'identification de populations résulte dans la nécessité de disposer d'une collection de témoins déjà analysés presque exhaustive. C'est déjà difficile pour des provenances naturelles, cela l'est encore plus pour les provenances introduites et les variétés synthétiques, peu nombreuses aujourd'hui, mais dont le nombre ira croissant.

Il existe cependant des exemples encourageants démontrant la faisabilité d'une telle discrimination, lorsque le polymorphisme des systèmes auxquels on fait appel est suffisant au niveau inter-populations, et lorsque le temps a permis d'accumuler une collection importante de témoins. À l'appui de cette thèse, il faut citer l'exemple désormais bien connu du Pin maritime et des travaux menés en collaboration par l'INRA et l'Université de Bordeaux I (Baradat, Bernard-Dagan, Marpeau). La discrimination des différentes races du Pin maritime se fonde sur un polymorphisme phénotypique important du profil terpénique. Le déterminisme génétique des différences individuelles a été prouvé en étudiant des croisements contrôlés. De même, les conditions d'échantillonnage et les procédures d'analyse ont été rigoureusement définies pour assurer la parfaite reproductibilité des résultats. Sur de jeunes plants, un seul terpène, le

« 3 carène » est utilisable. On peut classer les individus selon l'absence ou la présence de ce composé. La fréquence d'individus sans « 3 carène » constitue le critère d'appartenance à une race géographique. À titre d'exemple, les pourcentages moyens d'individus pauvres en « 3 carène » dans les peuplements des Landes, du Portugal ou du Nord-Ouest de l'Espagne et du Maroc sont les suivants : Landes 39 %, Portugal 73 %, Maroc 100 %. Évidemment ces pourcentages sont assortis de précisions variables suivant l'effectif de l'échantillon analysé. Sur un effectif de 30 plantules d'un même lot analysé, on démontre qu'un minimum de 17 individus sans « 3 carène » est nécessaire pour conclure à l'origine non landaise du lot. Ce test désormais informatisé est mis en œuvre par la cellule régionale d'expertise variétale mise sur pied par l'Université de Bordeaux I avec le concours de l'INRA et du SERFOB. Ce test ne doit évidemment pas être utilisé en dehors de ses conditions normales de validité (règles d'échantillonnage des lots de semences ou de plants, reconnaissance de populations et non pas identification de familles ou de clones s'écartant sensiblement des profils terpéniques moyens de ces populations-sources).

POSSIBILITÉS, LIMITES ET PERSPECTIVES DE DÉVELOPPEMENT DES MÉTHODES BIOCHIMIQUES DE CARACTÉRISATION VARIÉTALE DES ARBRES FORESTIERS

Pour autant que l'on dispose d'un nombre suffisant de gènes marqueurs et d'une typologie bien établie des populations ou des individus à reconnaître, la puissance de discrimination des méthodes biochimiques est souvent considérable. De plus, ces méthodes permettent souvent un diagnostic beaucoup plus précoce, au stade graine ou plantule notamment, ce qui représente un gain précieux de temps et d'argent. Les utilisations déjà connues sont nombreuses :

— Au niveau de la pratique, pour contrôler l'origine de lots de graines ou de plants destinés au reboisement, vérifier que la zone de récolte correspond bien à l'étiquette du lot et que celui-ci n'est pas un mélange. À elle seule, cette possibilité de contrôle est en mesure de dissuader d'éventuels fraudeurs. L'obtenteur d'une variété améliorée (variété synthétique ou variété clonale) peut aussi imaginer la marquer préventivement en introduisant dans son génome un ou plusieurs gènes rares et faciles à identifier, pour décourager les faussaires. Par confrontation avec une typologie génétique préalable de l'espèce, l'utilisation de marqueurs génétiques permet en principe de retrouver aussi l'origine des plantations.

— Au niveau de la recherche, les marqueurs génétiques sont susceptibles de multiples utilisations, pour affiner nos classifications systématiques, obtenir des évaluations chiffrées des distances génétiques entre populations et entre individus, étudier les systèmes de reproduction (en forêt ou en verger à graines), mesurer les coefficients moyens de consanguinité des individus et des populations, évaluer l'effet de différents modes de sylviculture (méthodes d'éclaircie et de régénération des peuplements) sur la structure génétique des populations, mais aussi étudier de manière fondamentale les relations plante-maladie ou plante-insecte, identifier une souche pathogène (champignon, bactérie, virus) pour mieux lutter contre elle.

Ces performances spectaculaires prêtées aux marqueurs biochimiques supposent évidemment un sérieux étalonnage préalable :

— Des preuves solides de la stabilité d'expression des marqueurs utilisés ou du moins une définition rigoureuse de leur plage de validité (variations avec l'organe considéré, l'âge, les conditions environnementales, les conditions de prélèvement de l'organe, d'extraction et de conservation des extraits), des protocoles de caractérisation parfaitement mis au point et standardisés.

M. ARBEZ

— Le respect des règles d'échantillonnage aux différents niveaux (nombre suffisant de gènes marqueurs pour échantillonner le génome d'un individu, fréquence suffisante dans les populations étudiées, nombre suffisant d'individus non apparentés par population pour représenter la population...) pour être en mesure de révéler des différences pertinentes, représentatives de celles qui existent dans les populations échantillonnées mises en comparaison.

— Des méthodes de mise en évidence simples, et automatisées pour en abaisser le prix de revient.

Même si le marché du diagnostic génétique en forêt n'est en rien comparable à celui des médecines humaine et vétérinaire, on peut s'attendre à un certain développement. L'extension des réglementations, l'utilisation de plus en plus fréquente des variétés améliorées en reboisement et la nécessité d'en garantir l'authenticité, la nécessité de disposer de méthodes opérationnelles et rapides de reconnaissance des clones, le développement des tests d'état sanitaire, obligeront à recourir de plus en plus fréquemment à ces méthodes de diagnostic.

M. ARBEZ

Directeur du Laboratoire

d'Amélioration des Arbres forestiers

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

PIERROTON 33610 CESTAS

BIBLIOGRAPHIE

- BARADAT (Ph.), BERNARD-DAGAN (C.), MARPEAU (A.). — Variation of terpenes within and between populations of maritime pine. In : Proceedings of the Conference on biochemical genetics of forest trees. — Umea (Sweden), 1978, pp. 151-168.
- BARADAT (Ph.), MARPEAU (A.). — Geographic variability of maritime pine for allelic frequencies at loci which control terpene synthesis. Application for characterization of the great groups of natural area and varietal tests. — Communication CEE DG 12, Bologne (Italie), 1987. — 12 p.
- BERGMANN (F.). — Genetic means of verifying observance of the law :
1 - Methodical principles of « provenance identification » ;
2 - Genetic characterization of orchard produced seeds ;
3 - Identifying multiclonal cultivars ;
in « Biochemical genetics and legislation of forest reproductive material ». — Proceedings of an IUFRO meeting held at Grosshansdorf (RFA), 1986.
- JUNG-MULLER (B.). — Variabilité morphologique et électrophorétique des peuplements introduits de Chêne rouge (*Quercus rubra* L.). — 1987. — 87 p. (Mémoire 3^e année ENITEF).
- MC DOUGAL (K.M.), PARKS (C.R.). — Environmental and genetic components of flavonoid variation in Red Oak, *Quercus rubra*. — *Biochemical systematics and ecology*, vol. 14, n° 3, 1986, pp. 291-298.
- RUDIN (D.). — Developmental trends in the field of biochemical genetics of forest trees. — Proceedings of the 18th IUFRO World Congress. Division 2, volume II, 1986, pp. 577-588.
- VOREUX (Ch.). — Les marqueurs génétiques et l'amélioration des arbres forestiers. — Nancy : Ecole nationale du Génie rural, des Eaux et des Forêts, 1986 (rapport de thème personnel).