

Contribution à l'étude de l'identification des pieds mâles et femelles chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par l'utilisation des marqueurs moléculaires RAPD

H. Zaher* et M. Baaziz**

* : INRA, Unité d'Amélioration des Plantes et Qualité, BP 533, Marrakech, E-mail : hayatzaher@yahoo.fr

** : Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, E-mail: baaziz@ucam.ac.ma / m_baaziz@hotmail.com

Résumé

La complexité du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) caractérisée par sa dioïcie, sa haute hétérozygotie et sa croissance lente rend, auparavant, impossible la détermination du sexe de la descendance d'un croisement au jeune âge. Toutefois, les techniques des marqueurs moléculaires fournissent des outils pour l'étude de ce mécanisme afin d'assister les programmes d'amélioration.

Dans cette étude, les marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) ont été utilisés pour l'identification du sexe chez 40 descendants de différents croisements contrôlés (20 mâles et 20 femelles). Après extraction de l'ADN à partir de jeunes folioles, l'utilisation de 27 amorces décanucléotidiques sur les bulks des mâles et des femelles a permis de sélectionner 25 % des amorces pour leur capacité de détection du polymorphisme entre les deux bulks. Par la suite, ces amorces ont été testées chez les individus mâles et femelles séparément. Cependant, l'analyse des profils RAPD individuels a montré une distribution aléatoire de la présence de la bande « marqueur » chez les deux sexes.

La technique RAPD peut être adoptée comme un outil pour l'identification du sexe au jeune âge pour une économie de moyens et une réduction des superficies expérimentales.

Mots clés : marqueur moléculaire, RAPD, *Phoenix dactylifera* L., dioïcie, sexe

Introduction

Le palmier dattier constitue la principale composante du système oasien avec une superficie totale d'environ 44 000 Ha correspondant à environ 4 430 000 palmiers (Anonyme, 1998). Cette espèce joue à la fois un rôle économique grâce à la production des dattes qui constituent la base de l'alimentation humaine et animale, et un rôle écologique puisqu'elle confère sa structure à l'oasis.

Par ailleurs, le système oasien est menacé par l'extension d'une grave maladie, le bayoud, dont l'agent causal est un champignon du sol, *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, qui aurait entraîné depuis le début du siècle, une perte de près de dix millions de palmiers dattiers et la disparition de certaines variétés de très haute qualité dont Berni et Idrar. Le seul moyen de lutte contre cette maladie reste la sélection ou la création de cultivars résistants et producteurs de fruits de grande valeur marchande pour reconstituer les palmeraies marocaines.

Etant donné que le palmier dattier est une espèce pérenne, il n'entre en production qu'après plusieurs années et par conséquent les données sur sa performance ne sont disponibles que lorsqu'il atteint l'âge de production. Ajoutant qu'il est dioïque, donc après la réalisation d'un croisement entre une variété

femelle et un mâle, la moitié de la descendance F1 est constituée de mâles non productifs, la datte constitue le produit final. Pour résoudre ce problème, l'application des marqueurs moléculaires dans le programme des croisements contrôlés pour l'identification précoce du sexe de la descendance aidera à obtenir des résultats à court terme.

Vu les coûts élevés de l'expérimentation, l'identification du sexe au jeune âge par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire s'avère nécessaire pour le gain de temps, l'économie de moyens et la réduction des superficies expérimentales.

Dans notre étude, nous avons utilisé un certain nombre de techniques moléculaires (PCR : Réaction de polymérisation en chaîne ; RAPD : polymorphisme de fragments d'ADN amplifiés par PCR) dans le but de trouver des marqueurs moléculaires liés au déterminisme du sexe chez le palmier dattier.

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

L'étude a porté sur 40 palmiers descendants F1 issus de croisements dirigés dont 20 mâles et 20 femelles. Les échantillons ont été apportés du Domaine

Expérimental de l'Institut National de la Recherche Agronomique à Zagora sous forme de jeunes folioles.

2. Extraction et purification de l'ADN total

La méthode utilisée pour l'extraction d'ADN total ne nécessite pas l'utilisation de l'Azote liquide a été mise au point au laboratoire dans la mesure où nous ne pouvions pas disposer d'Azote liquide de manière régulière (Medraoui, 2000 ; Qacif, 2003).

3. Amplification de fragments aléatoires d'ADN (RAPD)

La quantité de 10 µl de chaque extrait d'ADN dilué provenant de 20 individus mâles et de 20 individus femelles ont été rassemblés pour constituer deux solutions mélanges d'ADN " bulk " à (10 ng/µl) chacune (respectivement " bulk ♂ " et " bulk ♀").

Les solutions d'ADN sont diluées à 10 ng/µl. Les réactions d'amplification ont été effectuées par volume de 50 µl contenant du tampon B sans MgCl₂ (10 x), MgCl₂ (25 mM), dNTP

(1 mM), 2.5 µM de primer, 25 ng d'ADN correspondant aux individus ou aux "pools" et

1 unité de Taq polymérase. Le tout est recouvert de 30 µl d'huile minérale pour éviter toute évaporation. Un témoin sans ADN est réalisé lors de chaque manipulation pour révéler d'éventuelles contaminations par l'ADN exogène.

Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycler (Equibio ThermoJet, Eurogentec)

4. Electrophorèse des fragments d'ADN amplifiés

Les produits d'amplification ont été séparés sur un gel vertical de polyacrylamide à 7%. La migration se

fait dans le tampon TBE 1x (Tris : 89 mM ; acide borique : 89 mM ; EDTA : 2 mM). Après électrophorèse des ADN, les gels sont colorés avec le nitrate d'Argent et révélés selon Bassam et al. en 1993.

Résultats et discussion

1. Analyse des profils RAPD

Deux mélanges ont été préparés, l'un constitué de l'ADN de 20 individus mâles (bulk mâle) et l'autre des ADN de 20 individus femelles (bulk femelle). Les deux mélanges ont été analysés à l'aide de 27 amorces décanucléotidiques sous les conditions d'amplification présentées dans la partie Matériel et Méthodes afin de cribler des amorces donnant des fragments dans l'un et pas dans l'autre.

Environ 25 % des amorces testées ont généré un polymorphisme entre les deux bulks. Ainsi, les amorces (OPA02, OPA07, OPB17, OPE04, OPE11, OPE16, OPE19) ont révélé des fragments RAPD polymorphes entre les deux bulks (Fig.1). Si ces bandes correspondent à des marqueurs liés au déterminisme du sexe, elles devraient être présentes soit dans les profils des individus mâles (marqueurs RAPD liés au sexe mâle), soit exclusivement chez les individus femelles (marqueurs liés au sexe femelle). Par la suite, ces sept amorces ont été testées chez les individus mâles et femelles séparément.

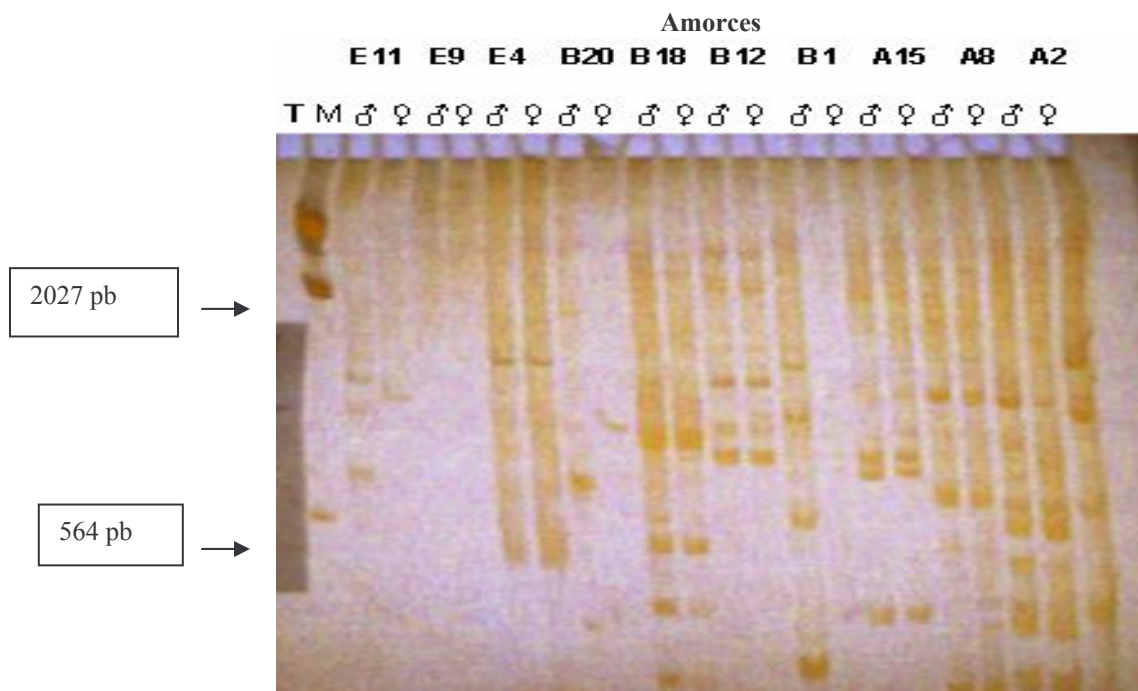


Fig.1 : Exemple de Profil RAPD sur gel de polyacrylamide obtenu à partir d'ADN de folioles du palmier dattier (bulk ♂ et ♀) amplifiés avec les amorces E11, E9, E4, B20, B18, B12, B1, A15, A8 et A2.

M: marqueur du poids moléculaire de l'ADN du phage λ digéré par HindIII.

T: correspond au témoin sans ADN matrice

3. Analyse d'un exemple de profil RAPD généré par l'amorce A02

L'analyse comparée des profils RAPD obtenus à partir des pools mâle et femelle a montré la présence d'une bande située entre 2027 et 564 pb uniquement dans le "bulk" femelle.

Par la suite, l'ADN total des 20 individus mâles et 20 individus femelles a été amplifié séparément en présence de la même amorce OPA02 (fig. 2). Cependant, on remarque la présence de la bande

"marqueur" dans la majorité des profils des individus analysés (mâles et femelles).

Ainsi, l'analyse des profils RAPD individuels montre une distribution aléatoire de la présence de la bande aussi bien chez les individus mâles que femelles.

Par conséquent le polymorphisme généré par l'amorce A02 ne peut pas être dû à une différence entre le génome mâle et femelle. Il peut être dû probablement à un changement dans les paramètres de fixation de l'amorce entre les ADN individuels et les ADN des "bulks"

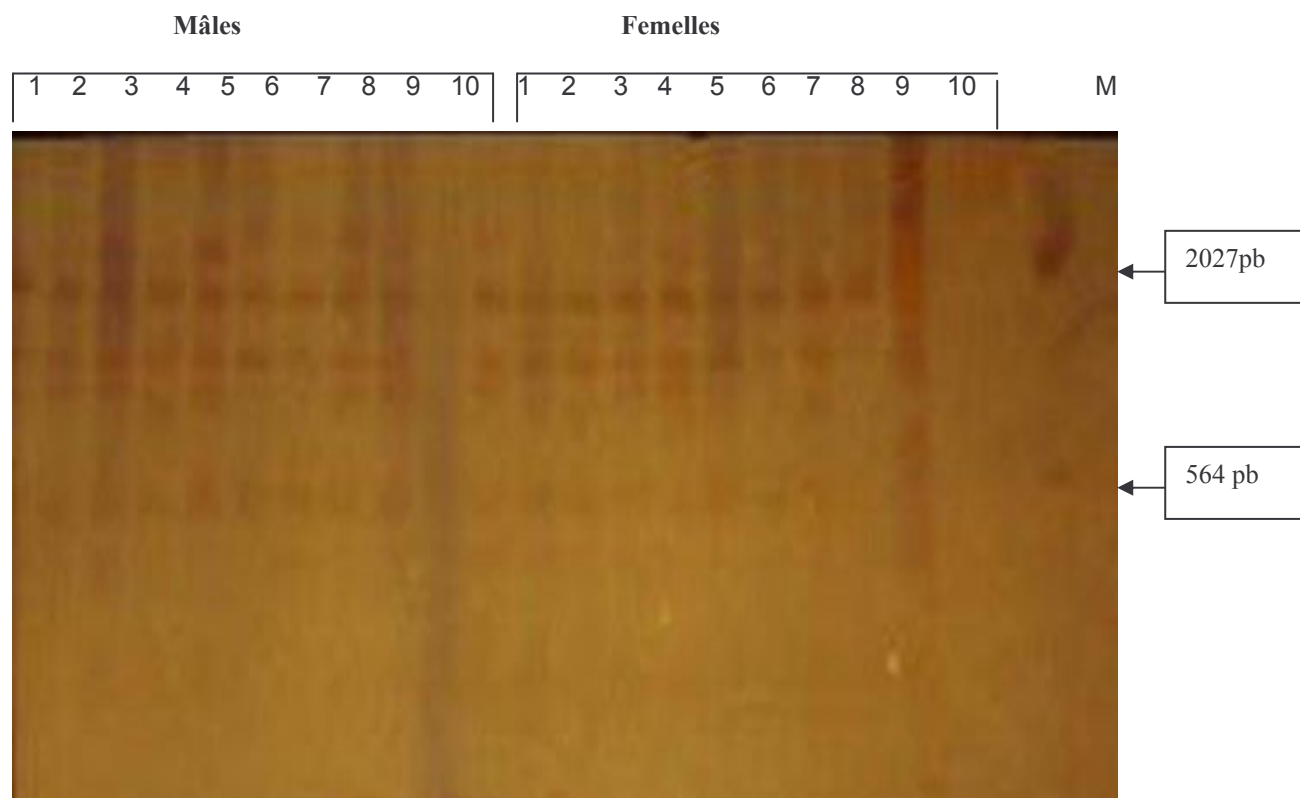


Fig. 2: Profil RAPD sur gel de polyacrylamide obtenu par amplification d'ADN des 10 mâles et 10 femelles du palmier dattier avec l'amorce A02. M: marqueur du poids moléculaire de l'ADN du phage λ digéré par HindIII

Sur ce, nous avons utilisé une approche similaire à la BSA "Bulked Segregant Analysis" pour rechercher un ou plusieurs marqueurs liés au déterminisme du sexe chez le palmier dattier.

Le principe de la BSA est de rassembler l'ADN des individus de phénotypes extrêmes sous forme de pools (Michelmore et al. 1991). Ceci dans le but de rechercher des marqueurs liés à un caractère donné dans une population en ségrégation à partir d'un croisement unique entre des parents se distinguant par le caractère en question (lignées iso géniques).

Ainsi, des "bulks" mâle ou femelle sont constitués. Sur l'ensemble de 27 amorces déca nucléotidiques utilisées, seules OPA02, OPA07, OPB17, OPE04,

OPE11, OPE16, OPE19 ont permis d'observer du polymorphisme.

A titre de comparaison, l'application de la BSA a permis à MICHELMORE et al. (1991) d'identifier trois marqueurs liés à la résistance au mildiou chez la laitue en criblant des "bulks" résistant et sensible avec 100 oligonucléotides arbitraires. PELSLEY et MERDINOGLU (1996) ont testé 160 amorces déca nucléotidiques pour identifier des marqueurs RAPD liés à la résistance au rhizomania chez la bettrave à sucre. En utilisant la même approche, Di Stilio et al. (1998) ont identifié un marqueur RAPD lié au sexe chez *Silene dioica*. Une étude similaire a été effectuée chez une autre espèce dioïque : la noix de muscade (K.N. Ganeshaiah et al 2004). Ces auteurs

ont identifié un marqueur spécifique des femelles (416 bp de long) suggérant ainsi que la femelle peut être hétérogamétique.

Comme conclusion à ce travail nous avons pu retenir ce qui suit :

- L'application de la "BSA" ne nous a pas permis, à ce stade de notre étude d'arriver à isoler un marqueur spécifique au caractère "sexe". Toutefois, les résultats obtenus avec les amorces testées semblent prometteurs et méritent d'être approfondis.

- Nécessité de tester les amorces sélectionnées sur la descendance complète du croisement en vérifiant la reproductibilité des résultats obtenus.

- Poursuivre l'analyse comparée des profils RAPD mâles et femelles en testant d'autres amorces déca nucléotidiques.

- Possibilité d'utiliser La technique RAPD pour l'identification du sexe au jeune âge pour une économie de moyens et une réduction des superficies expérimentales.

En perspectives, nous envisageons approfondir l'étude en utilisant les marqueurs RAPD sur un échantillon beaucoup plus représentatif de descendants avec l'utilisation d'un nombre plus grand d'amorces afin de pouvoir identifier des marqueurs du sexe.

Bibliographie

Anonyme, (1998). Plan National de restructuration et de développement de la palmeraie : Etat d'avancement et actions futures, Direction de la production végétale, MADRPM.

Bassam B.J. & Caetano-Anolles C. (1993). Protocols in biotechnology : Silver staining of DNA in

polyacrylamide gels. Applied Biochemistry and Biotechnology vol. 42: 181-188.

Di stilio S., Kesseli RV., & Mulcahy DI (1998). A pseudoautosomal random amplified polymorphic DNA marker for ex chromosomes of *Silene dioica*. *Genetics*. 149: 2057-2062.

Ganeshiah K.N., Ravishanka R. K.V., Lalitha Anand, Shibu M.P., & Shaanker UMA., (2004). Identification of sex-specific DNA markers in the dioecious tree, nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). PGR Newsletter N°121: 59-61. IPGRI – FAO

Medraoui L., (2000). Contribution à l'étude de la diversité génétique du palmier dattier (*Phoenix dactylefera* L.) par les marqueurs biochimiques et moléculaires. Optimisation des techniques d'extraction et de séparation des protéines, des enzymes et des acides nucléiques. Mémoire de D.E.S.A.

Michelmores RW., Paran I & Kesseli RV., (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific by using segregating populations. *Proc Natl acad Sci USA* 88: 8928-8932.

Pelsy F. & Merdinoglu D., (1996). Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA markers linked to a rhizomania resistance gene in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by bulked segregant analysis. *Plant Breeding* 115: 371-377.

Qacif N., (2003). Contribution à l'étude des marqueurs moléculaires chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Optimisation de la technique d'amplification aléatoire de l'ADN (RAPD). Mémoire de D.E.S.A