

Contribution à l'étude de l'introggression génétique entre *Quercus suber* L et *Q. rotundifolia* (Lamk.) Trabut au Maroc par l'utilisation des marqueurs microsatellites

Nadia BELAHBIB¹, Abdellah OUASSOU², Jamila DAHMANI¹ & Allal DOUIRA¹

1. Université Ibn Tofaïl, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire de Botanique et de Protection des Plantes. B.P. 133, Kénitra, Maroc. e-mail: lhbibnad@yahoo.fr

2. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Département d'Agronomie, Laboratoire d'amélioration génétique des plantes, B.P. 6202 Instituts, Rabat, Maroc.

Résumé. Les microsatellites (SSR_s), marqueurs codominants et très polymorphes, sont utilisés dans cette étude préliminaire pour vérifier l'introggression génétique entre le chêne-liège (*Quercus suber* L.) et le chêne vert (*Q. rotundifolia* (Lamk.) Trabut) cohabitant dans quelques subéraies marocaines du Moyen-Atlas et du Haut-Atlas. Cinq locus microsatellites chloroplastiques, issus de chênes européens, ont été utilisés pour cette analyse. Seulement trois locus microsatellites ont révélé un polymorphisme élevé et parmi eux un seul locus a montré un échange du génome chloroplastique entre les deux espèces.

Mots clés : Maroc, *Quercus suber*, introggression génétique, microsatellites, *Quercus rotundifolia*.

Contribution to the study of the genetic introggression between *Quercus suber* L. and *Q. rotundifolia* (Lamk.) Trabut in Morocco by the use of microsatellite markers.

Abstract. Simple sequence repeats (SSR_s) or microsatellites, codominant and highly polymorphic markers, are tested in this preliminary study for describing the genetic introggression between *Quercus suber* L. and *Q. rotundifolia* (Lamk.) Trabut, living together in the Middle Atlas and the High Atlas. Five chloroplast microsatellites loci identified in European oaks were used in this test. Only three microsatellites loci revealed a highly polymorphism and one microsatellite showed a genomic exchange between this two species.

Key words : Morocco, *Quercus suber*, introggression, microsatellites, *Quercus rotundifolia*.

INTRODUCTION

Les espèces du genre *Quercus* (Fagaceae) se trouvent dans toutes les régions tempérées de l'hémisphère Nord. Quatre cent cinquante espèces environ sont connues dans le monde entier, dont six sont spontanées au Maroc. Parmi ces dernières, le chêne-liège (*Quercus suber* L.) et le chêne vert (*Q. rotundifolia* (Lamk.) Trabut) occupent une place très importante dans le patrimoine forestier marocain. Ces derniers couvrent respectivement 320 000 ha et 1 400 000 ha env. (Benzyane 1996, Benabid 2000), manifestent des exigences écophysiological différentes (Sauvage 1961) et représentent un intérêt économique important.

D'après des travaux récents utilisant l'ADN chloroplastique (Belahbib *et al.* 2001), ces deux espèces sont très différenciées génétiquement lorsqu'elles ne sont pas en contact, alors que des échanges cytoplasmiques ont été détectés entre elles dans les zones sympatriques, et ceci malgré qu'elles appartiennent à deux sections différentes (Manos *et al.* 1999). Le chêne-liège peut avoir le variant (ou haplotype) du chêne vert tout en restant bien différencié sur le plan morphologique.

Dans cette étude préliminaire, nous cherchons à étudier la différenciation génétique entre le chêne-liège et le chêne vert dans des stations où les deux espèces sont en sympatrie. Nous avons utilisé comme marqueurs moléculaires des séquences d'ADN contenant des microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat). Ces derniers, caractérisés par un polymorphisme extrêmement élevé (polymorphisme de taille), sont multialléliques,

codominants (on peut distinguer les hétérozygotes des homozygotes) et neutres (De Vienne 1998).

Les principaux domaines dans lesquels les marqueurs microsatellites sont appliqués chez les arbres forestiers comprennent des études de paternité des individus, du flux de gènes, de la dissémination du pollen et/ou des graines et des modes de croisement (Lefort *et al.* 1998, Dow & Ashley 1998, Lexer *et al.* 1999).

Plusieurs études menées sur différentes espèces forestières soulignent que la méthode SSR a permis de décrire l'organisation de la diversité génétique, l'analyse de la paternité et du flux des gènes chez deux chênes français, (Streiff *et al.* 1999a), chez le Sapin (Zeigenhagen *et al.* 1998) ainsi que chez le Pin maritime (Vendramin *et al.* 1998, Mariette *et al.* 2001). Dans les programmes de la conservation des ressources génétiques forestières, la technique des microsatellites est utilisée pour contrôler les effets génétiques des pratiques sylvicoles et de la fragmentation des forêts.

L'objectif de la présente étude est de savoir (i) si cette technique est efficace pour vérifier l'événement d'introggression, responsable de l'échange cytoplasmique entre les deux espèces du genre *Quercus* au Maroc ; et (ii) si son utilisation permet de décrire la diversité génétique naturelle des subéraies marocaines.

MATERIEL ET METHODES

Choix des stations d'échantillonnage

D'après les résultats des travaux précédents (Belahbib *et al.* 2001), nous avons choisi des individus du Moyen-

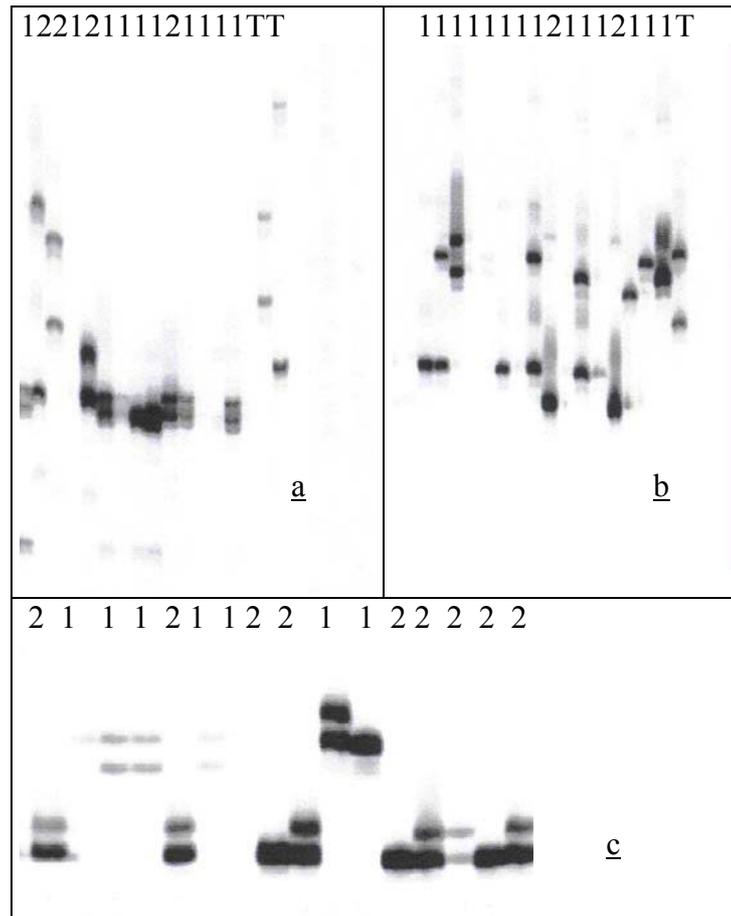


Figure 1. Diversité génétique détectée chez des individus de *Quercus suber* (1) et de *Quercus rotundifolia* (2) avec les trois locus microsattellites (a : QrZAG20 ; b : MSQ4 et c : QrZAG7). T : témoin (*Q. robur*). (dans le gel "a" deux individus du même témoin ; dans le gel "c" le témoin n'est pas visible).

Atlas, où *Q. suber* et *Q. rotundifolia* ont deux variants différents (respectivement S_1 et R_2), et du Haut-Atlas, où les deux espèces ont le même variant R_2 rencontré chez le chêne vert. Les analyses ont porté sur 84 arbres dont 54 *Q. suber* et 30 *Q. rotundifolia* qui coexistent ensemble, échantillonnés à partir de deux forêts du Moyen-Atlas (Jaaba et Ribaa), de la région de Ifrane, et de six stations reliques du Haut-Atlas s'étendant d'Azilal à Marrakech. Sur les gels d'amplifications, deux individus de chêne pédonculé (*Q. robur* L.) ont été passés pour être considérés comme témoins.

Extraction de l'ADN

Le protocole d'extraction d'ADN combine à la fois des actions mécaniques et chimiques qui vont permettre d'obtenir un culot d'ADN pratiquement pur, en utilisant la méthode de Doyle & Doyle (1990), modifiée par Dumolin *et al.* (1995). La même technique est suivie sauf que le broyage mécanique se fait à l'aide de deux cylindres d'acier qui tournent en écrasant une feuille de chêne jusqu'à la rendre sous forme d'une poudre humide ; le β -mercaptoéthanol est également remplacé par 1M de 1,4-Dithiotretol.

Amplification, Electrophorèse

Les réactions en chaîne de la polymérase (PCR) ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur Perkin Elmer GeneAmp PCR model 9600, dans un volume de 15 μ l contenant 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de chaque dNTPs (Pharmacia Biotech), 0,2 μ M de chaque amorce dont l'amorce F (Forward) est marquée avec un fluorochrome "IRD 800", du tampon 2X (Buffer Gibco BRL), 0,8 unités de Taq polymérase (Gibco BRL) et 5 μ l d'ADN dilué à 2 ng/ μ l. Le protocole d'amplification comprend une phase de dénaturation à 94°C durant 4 min, suivie par 35 cycles, comprenant chacun une étape de dénaturation à 94°C pendant 45 s, une étape d'hybridation à 50°C pendant 45 s (cette température est identique pour tous les locus utilisés dans cette étude) et une étape d'élongation à 72°C pendant 45 s.

Les produits d'amplification sont dénaturés à 94°C pendant 5 min. L'électrophorèse est effectuée sur gel à 6% de polyacrylamide en conditions dénaturantes [urée de 6M, TBE 10X séquenceur, ammonium persulfate (APS) 10% (sigma) et Temed (sigma)]. La révélation des différents allèles est réalisée grâce à l'IRD ("Infra Red Dye") qui est détecté par un rayon laser lors de la migration grâce à un séquenceur Li-Cor (DNAsequencer model 4000).

Marqueurs microsatellites

Les analyses ont porté sur cinq locus microsatellites chloroplastiques (ssrQpZAG119, ssrQpZAG9, ssrQrZAG7, ssrQrZAG20 et MSQ4) issus des travaux de Dow *et al.* (1995) et ceux de Steinbellner *et al.* (1997b) effectués sur d'autres espèces du genre *Quercus*. Le transfert de ces locus microsatellites a été confirmé chez *Q. suber* et *Q. cerris* par Hornero *et al.* (2001) et chez *Q. ilex* par Soto *et al.* (2003) ; sachant que *Q. cerris* et *Q. ilex* appartiennent respectivement aux mêmes sections que celles de *Q. suber* et *Q. rotundifolia* (Tutin *et al.* 1993). Ces marqueurs microsatellites comprennent des répétitions en tandem d'une séquence à "motif" court de type (GA)_n ou (AG)_n ou de type (TC)_n.

RESULTATS

Le premier objectif était de vérifier si l'amplification des amorces choisies au hasard, à partir d'autres espèces de chêne, pourraient être adaptées aux chêne-liège et chêne vert marocains. La lecture des gels d'amplification des amorces utilisées a montré que seule l'amorce QpZAG119 n'a donné aucun résultat chez les deux espèces analysées. Les amorces QrZAG20, MSQ4 et QrZAG7 ont montré un polymorphisme élevé, détecté chez les deux chênes étudiés (Fig. 1), tandis que le locus QpZAG9 a détecté une mutation de type délétion/insertion chez le chêne vert du Haut-Atlas.

L'analyse de la diversité de l'ADNcp par PCR-RFLP du chêne-liège du Haut-Atlas a montré intégralement la présence du chloroplaste du chêne vert dans son cytoplasme (Belahbib *et al.* 2001). Dans cette présente étude, seul QrZAG20 a révélé un échange du génome chloroplastique entre *Q. suber* et *Q. rotundifolia* : un seul chêne vert a le même haplotype que cinq chênes-lièges d'une même localité (Haut-Atlas).

Ceci reste à vérifier en augmentant le nombre d'individus par population. Le locus QrZAG7 montre que le chêne vert du Moyen-Atlas possède un seul haplotype et que celui du Haut-Atlas en a un second qui est absent chez les individus du Moyen-Atlas. Chez *Q. suber*, MSQ4 détecte du polymorphisme plus important que celui révélé par QrZAG20. Le locus QpZAG9 montre chez le chêne vert du Haut-Atlas une mutation de type délétion/insertion. Il amplifie seulement deux fragments et non quatre comme cela a été démontré chez *Quercus ilex* (Soto *et al.* 2003), qui pourrait être attribué au fait que l'amorce amplifie deux fragments par allèle à un simple locus, ou encore, par le fait qu'il ne s'agit pas de la même espèce alors que *Q. ilex* et *Q. rotundifolia* correspondent toutes deux au chêne vert méditerranéen.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Pour identifier les arbres chez *Quercus suber*, seulement trois loci SSR semblent suffisants, tels QrZAG7, QrZAG20 et MSQ4. Ils ont pu séparer génétiquement le chêne-liège du chêne vert dans le Haut-Atlas qui, à l'aide de la PCR-RFLP, avaient le même haplotype R_2 , c'est-à-dire identiques génétiquement.

Ces marqueurs microsatellites ont montré un polymorphisme intra-spécifique élevé suggérant qu'ils sont bien appropriés à l'étude de la diversité génétique des populations de chênes ; ceci est surtout dû au fait qu'ils sont codominants et très polymorphes. Ce polymorphisme a été observé également chez des espèces tempérées du genre *Quercus* (Dow *et al.* 1995, Steinkeller *et al.* 1997a) ; par contre, l'amplification inter-espèces de microsatellites n'a rencontré que peu de succès. Ce résultat est signalé aussi chez d'autres genres forestiers, tels que le genre *Pinus* (Mariette *et al.* 2000).

A l'intérieur du genre *Quercus*, les microsatellites sont bien conservés : leur transfert d'une espèce à l'autre se fait sans aucun obstacle (Soto *et al.* 2003). En effet, Les locus utilisés et qui sont développés à partir des chênes blancs, ont pu être amplifiés même chez le chêne-liège et le chêne vert marocains malgré qu'ils appartiennent à des espèces suffisamment différentes. Le locus QrZAG20 a démontré une autre fois que ces marqueurs sont transmis maternellement.

Cependant, la forte variabilité détectée au sein de chaque population étudiée montre que les microsatellites sont un outil moléculaire révélant que chaque individu d'une même population peut avoir un génotype unique, ce qui rend ces marqueurs utiles pour surveiller la dissémination des graines ou le flux de pollen. Ainsi, ces microsatellites peuvent être utilisés pour détecter, par exemple, la contamination des graines d'une provenance et confirmer l'existence de liens de demi-fratries dans les lots de graines provenant d'arbres individuels comme c'est le cas chez *Quercus robur* (Lexer *et al.* 1999), *Q. ilex* (Soto *et al.* 2003) et *Q. suber* (Hornero *et al.* 2001).

Au Maroc, 19 régions de provenances différentes ont été délimitées (El Yousfi *et al.* 1997) sur la base des conditions surtout écologiques. L'utilisation des microsatellites est un test comparatif rapide et efficace pour analyser les contaminants d'une provenance donnée ; il serait donc intéressant de renforcer l'homogénéisation de la région de provenance par la détermination des génotypes à l'aide de ce marqueur moléculaire. L'application pratique évidente permettra d'éviter les problèmes d'inadaptation écologique et donnera une bonne productivité du matériel végétal.

Néanmoins, cette présente recherche basée sur l'étude des marqueurs microsatellites chloroplastiques reste une étude préliminaire de la diversité génétique du chêne-liège marocain. D'une manière générale, l'échantillonnage pour cette analyse est certainement insuffisant pour conclure pleinement. Pour cela, il faudrait augmenter le nombre d'individus par population et faire un choix précis des subéaires à analyser. Les résultats obtenus dans les travaux précédents (Belahbib *et al.* 2001) à l'aide de l'ADN cytoplasmique sont intéressants, mais ne peuvent pas décrire en détail la diversité génétique de chaque population comme elle peut l'être à l'aide des marqueurs microsatellites. Ces deux types de marqueurs moléculaires semblent être complémentaires.

Ainsi, les marqueurs SSR sont un outil important pour une analyse plus fine de la structuration de la diversité génétique des populations d'arbres forestiers et de la

reconstruction du flux de gènes intra et inter-populations. Ils permettront d'avoir une idée sur les événements historiques de l'installation et la structuration génétique des populations. Ceci est particulièrement rentable pour les programmes de conservation, qui visent à préserver chez les espèces le plus de diversité possible à long terme.

Remerciements

Nous remercions infiniment M. Jalal El Oualidi chercheur à l'Institut Scientifique, pour son aide précieuse et son intérêt pour le sujet.

Références

- Belahbib N., Pemonge M.-H., Ouassou A., Sbay H., Kremer A. & Petit R.J. 2001. Frequent cytoplasmic exchanges between oak species that are not closely related: *Quercus suber* & *Q. ilex* in Morocco. *Molecular Ecology*, 10, 2003-2012.
- Benabid A. 2000. *Flore et écosystèmes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité*. Ed. Ibis Press, Paris, 359 p.
- Benziane M. 1997. Improvement strategy of forest tree species in Morocco : the case of cork oak. In: Turok J., Varela M.C. & Hansen C. (compilers) - European Forest Genetic Resources Program (Euforgen). *Quercus suber* Network by report of the third & fourth meeting, 1996/Italy, 1997/Spain, 60-67.
- De Vienne D. 1998. *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. 2^{ème} ed. INRA, Paris, 200 p.
- Dow B.D., Ashley M.V. & Howe H.F. 1995. Characterisation of highly variable (GA/CT)_n microsatellites in the bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Theoretical & Applied Genetics*, 91, 137-141.
- Dow B.D. & Ashley M.V. 1998. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *J. Heredity*, 89, 1, 62-70.
- Doyle J.J. & Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Dumolin S., Demeasure B. & Petit R.J. 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical & Applied Genetics*, 91, 1253-1256.
- El Yousfi S.M., Hoffmann D. & Mtarji B.A. 1997. Système réglementaire de récolte et d'utilisation des semences forestières au Maroc. *Ann. Rech. Forest. Maroc*, n° sp., 207-227.
- Hornero J., Gallego F.J., Martinez I. & Toribio M. 2001. Testing the conservation of *Quercus* spp. Microsatellites in the cork oak, *Q. suber* L. *Silvae Genetica*, 50, 3-4, 162-167.
- Lefort F., Lally M., Thompson D. & Douglas G.C. 1998. Morphological traits, microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. robur* L.) at Tullynally, Ireland. *Silvae Genetica*, 47, 257-262.
- Lexer C., Heinze B., Steinkellner H., Kamplfer S., Ziegenhagen B. & Glössl J. 1999. Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contaminations and inference of the seed parents from the offspring. *Theoretical & Applied Genetics*, 99, 185-191.
- Manos P.S., Doyle J.J. & Nixon K.C. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 12, 333-349.
- Mariette S., Chagne D., Decroocq S., Vendramin G.G., Lalanne C., Madur D. & Plomion Ch. 2001. Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. *Ann. Sci. Forest.* 58, 203-206.
- Mullis K.B. & Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* by a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- Sauvage Ch. 1961. Recherches géobotaniques sur les subéraies marocaines. *Trav. Inst. Sci. Chérifien*, Rabat, sér. botanique, 21, 462 p.
- Soto A., Lorenzo Z. & Gil L. 2003. Nuclear microsatellite markers for the identification of *Quercus ilex* L. and *Q. suber* L. hybrides. *Silvae Genetica*, 52, 2, 63-66.
- Streiff R., Ducouso A. & Kremer A. 1999. Organisation spatiale de la diversité génétique et flux pollinique dans une chênaie mixte. *Genetique Selection Evolution*, 30, S137-S152.
- Streinkellner H., Fluch S., Turetschek E., Lexer C., Streiff A., Kremer A., Burg K. & Glössl J. 1997a. Identification and characterisation of (GA/CT)_n – (n) – microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology*, 33, 6, 1093-1096.
- Streinkellner H., Lexer C., Turetschek E. & Glössl J. 1997b. Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*, 6, 1189-1194.
- Tutin T.G., Burges N.A., Chater A.O. & Edmonson J.R. 1993. *Flora Europea*. Cambridge University Press.
- Vendramin G.G., Anzidei M., Madaghiele A. & Bucci G. 1998. Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical & Applied Genetics*, 97, 456-463.
- Ziegenhagen B., Scholz F., Madaghiele A. & Vendramin G.G. 1998. Hypervariation chloroplast microsatellites as markers for paternity analysis in *Abies alba*. *Can. J. Forest Res.* 28, 317-321.

Manuscrit reçu le 26 mars 2004

Accepté le 10 décembre 2004