

PRINCIPES DE L'ÉLECTROPHORÈSE ET UTILISATION EN GÉNÉTIQUE FORESTIÈRE

par Ph. VIGNERON
Chercheur au Centre
Technique Forestier Tropical
Laboratoire d'électrophorèse du GERDAT

N.D.L.R. Nous publions dans les pages qui suivent un article sur le polymorphisme et la variété génétique de certaines provenances de *Terminalia superba*. Cette étude a été faite en utilisant la technique de l'électrophorèse. Nous avons donc pensé qu'il serait utile de rappeler à nos lecteurs les principes généraux de l'électrophorèse et de ses applications possibles en génétique forestière. C'est ce qui est fait ci-dessous.

THE PRINCIPLES OF ELECTROPHORESIS AND ITS APPLICATION TO FORESTRY GENETICS

N.D.L.R. In the pages that follow we publish an article on the polymorphism and genetic variety of certain provenances of *Terminalia superba*. This study was carried out using electrophoresis techniques and we therefore considered it appropriate to remind our readers of the general principles of electrophoresis and its feasible applications in forestry genetics. This subject is dealt with below.

PRINCIPIOS DE ELECTROFORESIS Y SUS APLICACIONES EN GENETICA FORESTAL

N.D.L.R. En las páginas que figuran a continuación, publicamos un artículo acerca del polimorfismo y la variedad genética de ciertas procedencias de *Terminalia superba*. Se ha llevado a cabo este estudio utilizando la técnica de la electroforesis y por ello, hemos pensado que sería de utilidad recordar a nuestros lectores los principios generales de la electroforesis y sus aplicaciones factibles en genética forestal, como así hemos hecho en todo cuanto figura a continuación.

Un ion et plus généralement toute particule chargée peut se déplacer sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines, qui sont constituées d'un assemblage linéaire d'acides aminés, sont porteuses d'une charge électrique nette lorsqu'elles sont placées à des pH autres que leur point isoélectrique. Dans un champ électrique elles vont donc migrer à une vitesse dépendant essentiellement de leur densité de charge (rapport charge électrique/masse). Plus grande est cette densité, plus rapide est la migration.

En veine liquide, c'est-à-dire dans un milieu non gélifié, la migration des protéines est perturbée essentiellement par des phénomènes de convection et de diffusion. De plus, l'échantillon étant déposé uniformément dans la veine en début de migration, la séparation des différentes classes protéiques n'est pas optimale.

L'utilisation de gel comme support permet dans une large mesure de se dégager de ces inconvénients. Les problèmes de convection sont résolus, la diffusion est extrêmement réduite et le dépôt de mélange à fractionner peut se faire à un endroit précis et en un volume limité.

Les principaux supports utilisés sont faits d'agarose, d'amidon ou de polyacrylamide. Le premier permet la migration de très grosses molécules. L'amidon (introduit par SMITHIES, 1955) et l'acrylamide (introduit par RAYMOND et WEINTRAUB, 1959), par leurs qualités techniques, sont les mieux appropriés à l'électrophorèse de protéines enzymatiques. En gel de polyacrylamide, où existe une maille dont on peut contrôler la taille, la vitesse de migration est dépendante non seulement de la densité de charge, mais aussi de l'encombrement de la molécule. La séparation contrôlée par deux

caractères peut être plus efficace que dans un gel d'amidon qui, lui, ne forme pas de maille. Deux protéines différant dans la combinaison de ces deux caractères migrent à des vitesses différentes et se séparent d'autant plus que dure

l'électrophorèse. Un mélange complexe de protéines peut de même être fractionné en autant de bandes qu'il existe de classes protéiques. Il reste ensuite à visualiser ces bandes protéiques et à les interpréter.

RÉVÉLATION

Chaque système enzymatique est spécifique de la réaction qu'il catalyse. L'enzyme mise dans des conditions appropriées (de pH, force ionique, en présence de cofacteurs...) catalyse la transformation d'un substrat qui lui est spécifique. Inversant la proposition, un substrat ne permettra la révélation que du système enzymatique qui lui est spécifique.

Une réaction colorée couplée ou enchaînée à la réaction principale permet sa localisation. L'ensemble des bandes colorées, ainsi révélées, présentées par un individu constitue un zymogramme. C'est l'**expression phénotypique** d'une partie des gènes de l'individu.

INTERPRÉTATION

Le déterminisme génétique des marqueurs enzymatiques peut être recherché par l'étude des zymogrammes de descendances obtenues en autofécondation ou en croisements contrôlés. Les bandes sont alors interprétées comme étant l'expres-

sion plus ou moins directe des allèles (les diverses formes alternatives d'un gène). Le phénotype (les bandes seules) permet alors d'accéder directement au génotype dont il est l'expression.

UTILISATIONS

Les caractères morphologiques sur lesquels porte l'amélioration génétique sont souvent gouvernés par de nombreux gènes. Une part importante de leur variance peut être due à l'environnement. Un même phénotype peut être l'expression de plusieurs génotypes. Leur étude relève de la génétique quantitative.

Les caractères enzymatiques, pour lesquels on trouve bien souvent une relation directe et unique entre phénotype et génotype, permettent des comparaisons entre individus en se libérant des effets de l'environnement. Leur déterminisme simple permet des études de génétique des populations. Bien que leur principal défaut soit de n'être que très rarement liés à la valeur agronomique des individus, leur intérêt en amélioration des plantes a été très rapidement perçu.

Un certain nombre d'auteurs, et principalement FERET et BERGMANN (1976), ADAMS (1979), BROWN et MORAN (1979) font le point des possibilités de l'électrophorèse en génétique forestière.

Les isozymes étant très généralement des marqueurs génétiques fiables, ils permettent de déterminer le génotype d'un individu pour un certain nombre de loci.

Un locus possédant deux formes alléliques (a et b) permet de générer trois génotypes diploïdes différents (les deux homozygotes aa, bb et l'hétérozygote ab). Si n loci de ce type sont étudiés, on peut s'attendre à trouver 3^n génotypes différents

(243 pour 5 loci et 59 049 pour 10 loci). Cette valeur augmente avec le nombre de loci mais aussi avec celui des allèles par locus. Si on tire au sort deux individus, la probabilité qu'ils soient identiques décroît très rapidement lorsque n croît. En fait les probabilités d'apparition des divers génotypes ne sont pas identiques. Elles dépendent des fréquences alléliques, du mode de reproduction de l'espèce considérée, des liaisons plus ou moins étroites pouvant exister entre les différents loci (linkage) et du degré d'apparentement entre individus.

L'électrophorèse reste pourtant un outil puissant pour l'**identification** de géniteurs ou de clones. Dans un verger à graines multiclonal de *Pinus taeda* L. utilisant 12 loci polymorphes, HUNTER (1977) identifie sans ambiguïté les 27 clones présents. Il devient alors possible de s'assurer de l'identité d'un ramet sur l'origine duquel existent des doutes. Il en est de même pour celle de géniteurs : contrôle de l'origine de greffes d'arbres plus utilisés pour effectuer des croisements contrôlés, recherche de la paternité ou de la validité d'un croisement performant...

RUDIN et LINDGREN (1977) résument les utilisations de la variabilité enzymatique dans la gestion des vergers à graines : contrôle de l'**efficacité du brassage génétique** (évaluation de la contribution réelle de chaque clone) et de la « pollution » par des pollens étrangers.

De nombreux auteurs ont mis à profit l'électrophorèse pour l'étude du **régime de reproduction**. La connaissance des taux d'auto et allogamie est en effet de toute première importance pour le choix d'un schéma de sélection. Citons, entre autres, les études sur *Eucalyptus obliqua* (BROWN *et al.*, 1975), *E. pauciflora* (PHILLIPS et BROWN, 1977), *Picea abies* (MULLER, 1977), *Pinus sylvestris* (RUDIN, 1977), *P. taeda* (ADAMS et JOLY, 1980), *P. ponderosa* (MITTON *et al.*, 1981) et *Pseudotsuga menziessii* (SHAW et ALLARD, 1979).

De même qu'un individu peut être caractérisé par son génotype, un groupe d'individus sera identifié par l'ensemble des génotypes qu'il contient. On s'intéresse alors aux fréquences alléliques, à la présence d'allèles spécifiques, à la fréquence des loci à l'état hétérozygote ou homozygote.

En 1972, BERGMANN montre aux forestiers l'intérêt de l'électrophorèse pour la **certification des semences**. Si chaque provenance est caractérisée par des fréquences alléliques, des taux d'hétérozygotie, il est alors possible d'identifier rapidement l'origine d'un lot de graines sans faire appel à de coûteuses plantations comparatives.

Les populations naturelles présentent un certain polymorphisme qu'il est possible d'évaluer par les méthodes de la génétique quantitative et par l'étude de la diversité enzymatique. Il est important pour l'améliorateur de connaître la **structuration de cette diversité** pour chaque provenance ainsi que les divergences existant entre provenances. Le choix d'un programme peut alors s'orienter vers une sélection d'origines ou d'arbres plus.

La mise en place d'essais comparatifs de provenances, de parcelles conservatoires peut de même être plus rigoureuse.

Par ailleurs, la mesure des **distances génétiques** entre populations permet l'orientation préférentielle d'un programme de croisements. Il est généralement admis que la divergence génétique entre géniteurs conditionne assez étroitement leurs **valeurs en croisement**. L'électrophorèse aide donc dans une certaine mesure à la prédiction de la valeur relative des croisements entre provenances. Bien que peu de résultats expérimentaux soient actuellement disponibles, c'est vraisemblablement là une application prometteuse des études électrophorétiques.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS W.T., 1979. — Applying isozyme analysis in tree-breeding programs. In Proceeding of Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects. July 27, 1979, Berkeley, California.
- ADAMS W.T. et JOLY R.J., 1980. — Allozyme studies in loblolly pine seed orchards : clonal variation and the frequency of progeny due to self-fertilization. *Silvae Genetica*, 29, 1-4.
- BERGMANN F., 1972. — Experiments on possibilities for genetic certification of forest seed. Proc. IUFRO and SABRO joint meeting, Tokyo, 1972.
- BROWN A.H.D. et MORAN G.F., 1979. — Isozymes and the genetic resources of forest trees. In Proceedings of Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects. July 27, 1979, Berkeley, California.
- BROWN A.H.D., MATHESON A.C. et ELDRIDGE K.G., 1975. — Estimation of the mating system of *Eucalyptus obliqua* L'Herit. by using allozyme polymorphisms. *Aust. J. Bot.*, 23, 931-949.
- FERET P.P. et BERGMANN F., 1976. — Gel electrophoresis of proteins and enzymes. In Modern Methods in Forest Genetics. Proceedings in *Life Sciences* Miksche, J.P. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- HUNTER S.C., 1977. — An electrophoretic analysis of isozyme variation in a Piedmont loblolly pine seed orchard. M.S. Thesis, North Carolina, State Univ. Raleigh, 48 p.
- MITTON J.B., LINHART Y.D., DAVIS M.L. et STURGEON K.B., 1981. — Estimation of outcrossing in ponderosa pine, *Pinus ponderosa* Laws. from patterns of segregation of protein polymorphism and from frequencies of albino seedlings. *Silvae Genetica*, 30, 117-121.
- MULLER G., 1977. — Untersuchungen über die natürliche Selbstbefruchtung in beständen der Fichte (*Picea abies* (L.), Karst.) und Kiefer (*Pinus sylvestris* L.). *Silvae Genetica*, 26, 207-217.
- PHILLIPS M.A. et BROWN A.H.D., 1977. — Mating system and hybridity in *Eucalyptus pauciflora*. *Aust. J. Biol. Sc.*, 30, 337-344.
- RAYMOND S. et WEINTRAUB L., 1959. — Acrylamide gel as a support medium for zone electrophoresis. *Science* 130, 711.
- RUDIN D., 1977. — The isozyme technique : a short-cut to the genes of our forest trees ? Illustration using *Pinus sylvestris* L. Thesis, University of UMEA.
- RUDIN D. et LINDGREN D., 1977. — Isozyme studies in seed orchards. *Studia Forestalia Suecica*, 139, 20 p.
- SHAW D.V. et ALLARD R.W., 1981. — Analysis of mating system parameters and population structure in Douglas-fir using single-locus and multilocus methods, p. 18-22. In Proceedings of Symposium on North America Forest Trees and Forest Insects. July 27, 1979, Berkeley, California.
- SMITHIES O., 1955. — Zone electrophoresis in starch gels : Group variation in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61, 629-641.