

Identification de cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) par l'amplification aléatoire d'ADN (RAPD)

Abdallah Ben Abdallah, Kadija Stiti, Philippe Lepoivre, Patrick du Jardin

Au Maghreb, de nombreux problèmes se posent à la culture du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Cette espèce dioïque et hétérozygote possède un mode de reproduction lent, faisant appel aux rejets, ce qui ne permet pas de multiplier efficacement les génotypes femelles performants et/ou en voie de disparition et les génotypes mâles peu diffusés [1]. Par ailleurs, le palmier dattier est sujet à plusieurs maladies notamment le « Bayoud » (fusariose causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*) qui a détruit, en un siècle, 15 millions de palmiers au Maghreb [2]. La sélection des variétés de qualité et résistantes à la maladie par les seules méthodes conventionnelles de la génétique est très lente, voire utopique. Par ailleurs, des difficultés se posent aussi bien pour la reconnaissance des cultivars existants (par manque de critères fiables discriminants) que pour l'assistance et l'évaluation des programmes de croisements dirigés entamés depuis quelques années dans les trois pays du Maghreb.

Ces divers problèmes ont rendu indispensable l'utilisation de la culture de tissus pour la micropropagation en masse de dattiers sélectionnés, résistants et/ou de bonne qualité. L'utilisation des biotechnologies et de la biologie moléculaire pour l'amélioration de cette espèce est demeurée limitée. Chez le palmier dattier, le polymorphisme enzymatique, mis en évidence par la technique des zymogrammes, a été utilisé pour l'étude du contrôle génétique de cinq systèmes enzymatiques (estérases, alcool déshydrogénase, glutamate-oxaloacétate transaminase, phosphoglucose isomérase) pouvant servir de marqueurs génétiques [3]. L'identification variétale de plusieurs cultivars marocains [4] et algérien [5] a été établie sur base de profils enzymatiques. D'autres travaux ont tenté de caractériser des profils peroxydases spécifiques de cultivars réputés résistants au Bayoud [6]. D'autres systèmes enzymatiques ont permis d'analyser les variations isoenzymatiques en fonction du stade de développement et de la méthode de régénération *in vitro* [7].

Durant les quinze dernières années, l'expression phénotypique du génome a été la plus utilisée pour caractériser le palmier dattier. Axée essentiellement sur l'étude du polymorphisme enzymatique, cette technique, malgré une simplicité apparente, n'a de crédit que si elle est appliquée en prenant plusieurs facteurs en considération : le matériel végétal, les conditions de culture, l'âge et le stade de la culture, la nature de l'explant, la définition des paramètres physico-chimiques de la croissance, ce qui rend délicat le choix d'un marqueur.

Récemment, les travaux se sont intéressés à la constitution génomique même. L'analyse de l'ADN mitochondrial de deux cultivars différents du palmier dattier, l'un résistant et l'autre sensible au Bayoud, a mis en évidence un polymorphisme par RFLP au niveau des profils de restriction Sal I et HindIII. Par ailleurs, différents plasmides circulaires superenroulés ont été mis en évidence ; leur taille semble être corrélée au caractère de résistance ou sensibilité au Bayoud chez six cultivars étudiés [8]. D'autres travaux d'exploration de génome du palmier dattier au moyen de la technique RFLP ont montré des variations génomiques inter et intravariétales et ont distingué les deux cultivars « Zahidi » et « Boustami noire » sur base d'un polymorphisme de longueur [7] (encadrés 1 et 2).

La technique RAPD [9] pour l'identification variétale, l'analyse de la diversité génétique et l'étude de la stabilité génétique au cours de la micropropagation a été appliquée récemment sur de nombreuses espèces, dont le figuier [10] où 19 marqueurs de type RAPD reproductibles ont été mis en évidence sur 17 génotypes, ainsi que chez l'épicéa (*Picea abies* (L.) Karst.), où la technique RAPD a permis d'étudier la stabilité génétique des populations produites par embryogenèse somatique [11]. Chez le pommier, en dépit d'une hétérozygotie élevée, l'utilité des marqueurs RAPD dans la recherche d'empreintes génétiques a été montrée sur plusieurs cultivars et leurs descendants [12]. Chez la vigne, les marqueurs RAPD (utilisant une amorce ou un mélange de deux amorces) ont permis d'étudier le poly-

A. Ben Abdallah : Laboratoire de biotechnologie, Institut national de la recherche agronomique de Tunisie (INRAT), rue Hédi-Karray, 2049 Ariana, Tunis, Tunisie.

A. Ben Abdallah, K. Stiti, P. du Jardin : Unité de biologie végétale, Faculté universitaire des sciences agronomiques, passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux, Belgique.

A. Ben Abdallah, P. Lepoivre : Unité de phytopathologie, Faculté universitaire des sciences agronomiques, passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux, Belgique.

Tirés à part : A. Ben Abdallah

Tableau

Optimisation des paramètres de la réaction d'amplification aléatoire de l'ADN des feuilles du palmier dattier par RAPD

Paramètres de la réaction (volume 25 µl)	Conditions optimales	Observations
ADN (ng)	10-40	< 10 : perte de bandes > 40 : apparition d'insolubles
Taq ADN-polymérase (unités)	1	< 0,85 : perte de bandes > 0,85 : reproductibilité des bandes
dNTP (µmol)	100-300	< 100 : perte de bandes > 300 : perte de bandes
MgCl ₂ (mmol)	2,5-6	< 2,5 : apparition de bandes de faible taille > 6 : perte de bandes
Oligonucléotides (pmol)	15-60	< 15 : réduction de l'intensité des bandes > 60 : apparition de bandes de faible taille
Température de la 1 ^{re} dénaturation (°C)	94	96 : présence de traînées et perte des bandes
Température d'hybridation des amorces (°C)	37	à 37 °C : meilleures amplifications qu'à 34 °C
Nombre de cycles d'amplification	45	30 à 35 : perte de bandes
Temps de la dernière élongation (min)	10-20	< 10 : perte de bandes 15 à 20 : résultat constant

Optimization of different parameters of random amplification DNA reaction of date palm leaves by RAPD

l'aide d'un appareil à billes métalliques en présence d'azote liquide (feuilles très lignifiées). Une solution saline préchauffée a été additionnée lors de la purification, afin d'éliminer les débris cellulaires et d'améliorer le séchage sous vide ainsi que la solubilisation de l'ADN.

Conditions d'amplification

L'amplification a été réalisée dans un premier temps, selon la technique adaptée de Vroh *et al.* [18]. Chaque réaction RAPD de 25 µl contenait 200 µmol de dNTP, 20 pmol d'amorce, 2 mmol de MgCl₂, 50 ng d'ADN génomique, 1 unité de Taq ADN polymérase (Pharmacia) et le tampon fourni avec la Taq ADN polymérase. Après une prédénaturation à 94 °C pendant 5 min, l'amplification de 45 cycles a été conduite sur un thermocycleur Gene E (Techne) programmé comme suit : le cycle comportait une dénaturation à 94 °C pendant 1 min, une hybridation des amorces à 34 °C pendant 1 min et une élongation à 72 °C pendant 2 min. La dernière étape de la réaction d'amplification consiste en une élongation à 72 °C pendant 10 min. Chaque test de réaction RAPD a été accompagné d'un témoin négatif contenant tous les réactifs à l'exception de l'ADN matrice.

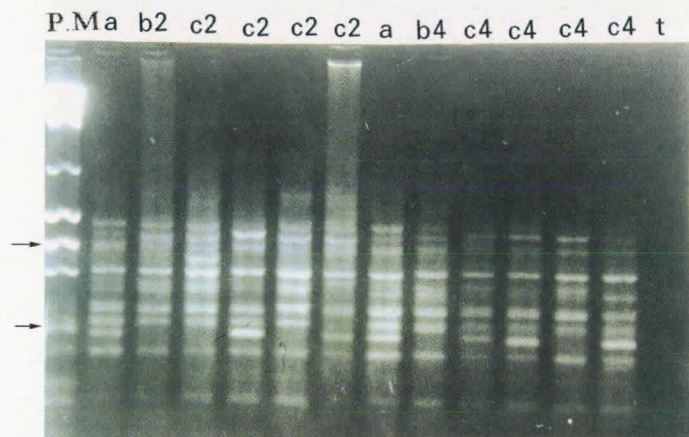
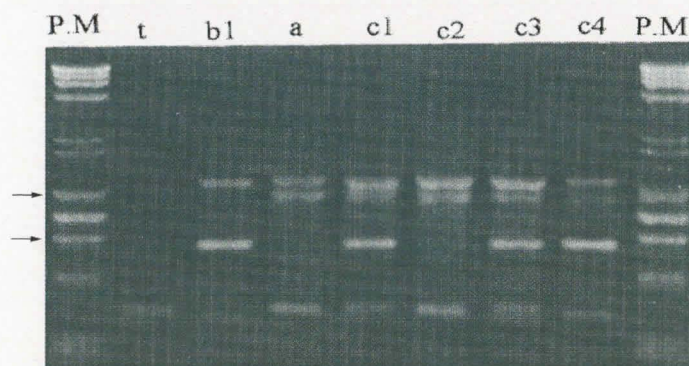
Pour adapter les conditions d'amplification au matériel du palmier dattier, les différents paramètres de la réaction RAPD ont fait l'objet d'optimisation. Les concentrations testées pour les constituants de la réaction ont été pour l'ADN extrait des feuilles (en ng) : 5-10-15-20-25-30-35-40-50-150-250-350, pour dNTP (en µmol) : 50-100-150-200-250-300-400, pour MgCl₂ (en mmol) : 1-1,5-2-2,5-3-4-6, pour les amorces (Oligonucléotides en pmol) : 5-10-15-20-25-30-60, pour la Taq ADN-polymérase (en unités) : 0,25-0,5-0,85-1-1,5-2. Par ailleurs, pour la température de la première dénaturation, une comparaison entre 94 °C et 96 °C a été réalisée. Pour l'hybridation des amorces, la température de 37 °C a été comparée à celle de 34 °C, tandis que différentes durées (0-10-15-20 min) à 72 °C ont été testées pour la dernière élongation. Le nombre des cycles d'amplification, après 45 cycles, a été comparé à ceux obtenus respectivement après 30-35-40 cycles. Le choix de la Taq ADN-polymérase a été optimisé. Une première sélection des amorces a été réalisée en retenant celles qui fournissent des produits amplifiés chez les 4 cultivars femelles et le génotype mâle. Dans une seconde phase les amorces retenues ont été utilisées pour distinguer les parents de leurs descendants hybrides.

Cent vingt-deux d'entre elles appartenant à 5 kits d'Opéron Technologies, États-Unis (ABCDE) ont été testées sur 4 cultivars femelles, un génotype mâle et leurs descendants hybrides (F1). Les amorces testées sont de 10 bases avec une composition en nucléotides GC dépassant 50 %. Dix µl de chaque réaction ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1,8 % dans un tampon TAE 1x et à une intensité de 45 mA pendant 120 min. La visualisation des résultats RAPD a été faite au bromure d'éthidium sous lumière UV. Les marqueurs de poids moléculaires utilisés ont été l'ADN des phages lambda et Phi X174 digéré respectivement par les enzymes de restriction HindIII et HaeIII. Dans les différents tests réalisés chaque réaction a été répétée trois fois et seules les amplifications reproductibles ont été retenues.

Résultats

Optimisation de la réaction d'amplification

Partant des conditions mise au point sur le cotonnier [18] et suite aux analyses des différents paramètres de la réaction RAPD, nous avons établi les conditions optimales



Photos 1 et 2. Profils RAPD de génotypes de palmier dattier obtenus avec l'amorce polymorphe OPD-16 (Operon Technologie) [Photo 1]: (a) Parent mâle T23 de la collection des pollinisateurs à Tozeur ; (b1) Parent femelle Deglet nour ; (c1, c2, c3, c4) hybrides F1 obtenus par croisement entre le mâle T23 et la femelle Deglet nour [Photo 2]: Profils obtenus avec l'amorce polymorphe OPE-16 (Operon Technologie) (b2) Parent femelle Deglet nour ; (c1, c2, c3, c4) hybrides F1 obtenus par croisement entre le mâle T23 et la femelle Deglet nour ; (b3) Parent femelle Kentichi ; (c'1, c'2, c'3, c'4) hybrides F1 obtenus par croisement entre le mâle T23 et la femelle Kentichi. Les conditions de la réaction RAPD ont été les suivantes : un volume

de réaction de 25 µl, 20 ng d'ADN matrice, une unité d'enzyme Taq DNA polymérase (Pharmacia) et la migration a été réalisée sur gel d'agarose 1,8% ; (P.M) marqueur de poids moléculaire avec taille exprimée en kb ; (t) témoin négatif (pas d'ADN matrice) ; (→) allèle à l'état hétérozygote chez l'un des parents ségrégeant chez les hybrides.

Photos 1 and 2. RAPD patterns of date palm genotypes [Photo 1]: (a) male parent T23 from pollinators collection in Tozeur (Tunisia) ; (b1) female parent Deglet nour ; (c1, c2, c3, c4) Hybrids F1 between T23 and Deglet nour: patterns amplified with primer OPD-16 (Operon Technologie Inc). [Photo 2]: (b2) female parent Deglet nour ; (c1, c2, c3, c4) Hybrids F1 (T23 X Deglet nour) ; (b3) female parent Kentichi ; (c'1, c'2, c'3, c'4) Hybrids F1 (T23 X Kentichi). Patterns amplified with primer OPE-16 (Operon Technologie Inc). RAPD conditions were the following : total volume 25 µl, 20 ng of date palm DNA and 1 U Taq polymerase (Pharmacia). The RAPD products were resolved on 1.8% agarose gel and visualised by ethidium bromide staining. (P.M) molecular size marker, (t) negative control, (→) heterozygous allele in one of the parents segregating in the hybrids.

d'amplification aléatoire de l'ADN extrait des feuilles du palmier dattier. Ces conditions optimales ont été définies sur base du nombre de bandes détectées (paramètre principalement influencé par la quantité d'ADN, de Taq-polymérase, de dNTP, de MgCl₂, la température de dénaturation et le nombre de cycles) et de leur répétabilité partant d'une même préparation d'ADN (principalement influencée par la température d'élongation et la concentration en Taq-polymérase) (tableau).

Résultats des amplifications et sélection des amorces

En vue de l'identification variétale, un ensemble de 122 amorces a été testé sur

4 cultivars femelles (Deglet Nour, Allig, Menakher et Kentichi) et un génotype mâle T23, et sur des descendants hybrides de ces cultivars croisés avec le génotype T23, en vue d'obtenir un patron hybride. Cette sélection a permis de retenir 11 amorces polymorphes ayant généré un total de 342 bandes de tailles variant de 232 pb à 310 pb. Parmi ces bandes, seules 53 correspondent à des loci polymorphes (soit 12,5% du total des bandes) qui constituent l'ensemble des marqueurs RAPD utilisés. Le nombre des bandes par amorce varie de 1 à 13 (avec un nombre moyen de 6 bandes). Différents profils d'amplifications ont été obtenus pour chaque cultivar en fonction de l'amorce utilisée. Les amorces OPD-16, OPE-16 et OPA-16 ont

fourni un polymorphisme pour les 4 cultivars femelles, le génotype mâle T23 et les descendants hybrides. Pour chaque croisement entre un cultivar femelle et le géniteur mâle T23, une ou plusieurs amorces différenciant les hybrides des parents ont pu être identifiées : OPE-09, OPA-07, OPD-05-06-19-16 (cultivar Menakher), OPA-07, OPC-07 et OPD-16 (cultivar Allig), OPA-04, OPA-16, OPE-16, OPD16 (cultivar Deglet nour), OPA-16, OPE-16 et OPD-16 (cultivar Kentichi).

Les amorces OPD-16 (photo 1) et OPE-16 (photo 2) ont été plus performantes, avec des produits reproductibles pour chacune de trois amplifications, tant pour l'identification variétale (en permettant de distinguer des profils multilocus différents) que pour la différenciation des descendants hybrides F1.

Discussion et conclusion

Nos résultats montrent que l'application des marqueurs RAPD pour l'identification de variétés et hybrides F1 du palmier dattier a fourni un polymorphisme reproductible pour 53 marqueurs RAPD sur 4 cultivars femelles, un génotype mâle T23 et des descendants hybrides. Les amorces OPE-16, OPA-16, OPD-16 ont permis de détecter un polymorphisme chez tous les cultivars étudiés, OPD-16 et OPE-16 fournissant le plus grand nombre des bandes polymorphes.

Nos travaux indiquent que le nombre de fragments amplifiés varie en fonction de l'amorce et du génotype, ce qui est en accord avec d'autres résultats [19], la répétabilité de l'amplification étant principalement fonction des conditions expérimentales.

Les 53 bandes polymorphes sont des marqueurs RAPD qui peuvent servir à identifier aussi bien les cultivars que les hybrides F1 du palmier dattier. Cette technique est facile et rapide à mettre en œuvre mais elle exige un travail préalable laborieux de sélection des amorces (sur un total de 122 amorces et 342 bandes expérimentées, seules 11 amorces et 53 bandes ont été utiles pour l'identification variétale et la différenciation des hybrides).

La mise au point des marqueurs RAPD incite à l'utilisation des marqueurs moléculaires dans l'exploration et l'analyse du génome du palmier dattier, espèce de régions semi-arides qui profite peu des

Summary

Date palm cultivar identification using random amplified polymorphic DNA RAPD markers

A. Ben Abdallah, *et al.*

Genomic DNA was extracted from leaves of date palm (*Phoenix dactylifera* L.): four female cultivars (Deglet nour, Allig, Kentichi, Menakher), a male genotype Pollinator T23, and F1 hybrids. Amplification of genomic DNA was done by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Out of 122 primers tested, 11 were selected as reproducible with 53 polymorphic bands (12.5% of the total). The RAPD thus obtained were successfully used to differentiate between female cultivars, male T23, and F1 hybrids. The polymorphism detected and its reproducibility suggested that these markers can be used for varietal identification, evaluation of the date palm potential (a lack of discriminant criteria between cultivars is observed), study of the genetic diversity of date palm cultivars, and assistance to control "bayoud disease" programs in the Maghreb countries.

Cahiers Agricultures 2000 ; 9 : 103-7.

initiatives internationales dans ce domaine. La technique RAPD mise au point pour la première fois par Williams *et al.* [9] constitue un outil fiable, ne demandant que de très faibles quantités d'ADN pour explorer le polymorphisme génétique [16]. Nos travaux ont montré sa faisabilité et son efficacité chez le palmier dattier ; elle permettrait l'évaluation des ressources phœnicicoles et l'identification variétale (dans le sud de la Tunisie, 240 cultivars femelles ont été recensés sur la base de critères peu discriminants et 200 pollinisateurs mis en collection depuis les années 50-60).

Les marqueurs de type RAPD peuvent aussi être envisagés dans l'assistance aux programmes de croisements dirigés et dans la mise au point des marqueurs associés à des caractères agronomiques essentiels ou à la résistance à des maladies comme le Bayoud. Les marqueurs sont à coupler dans certains cas à d'autres techniques, comme celles utilisant les microsatellites, ou plus récemment l'AFLP [20]. Ces techniques simples, qui ne font pas appel obligatoirement à la radioactivité, pourraient aussi être envisagées dans l'identification de marqueurs associés au sexe chez le palmier dattier, afin d'éliminer précocement les individus mâles dans les programmes de croisements dirigés mis en œuvre dans les trois pays du Maghreb ■

Résumé

L'analyse de l'ADN génomique des feuilles du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) chez quatre cultivars femelles (Deglet nour, Allig, Kentichi, Menakher), un génotype mâle (T23) et leurs descendants hybrides a été réalisée par la technique RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). Des amorces révélant un polymorphisme reproductible au sein de ces génotypes ont été sélectionnées, soit 53 bandes polymorphes (soit 12,5 % du total des bandes) résultant de l'utilisation de 11 amorces sélectionnées parmi 122 testées. Les marqueurs RAPD ont permis de caractériser et de distinguer les différents cultivars, tout en différenciant les géniteurs de leurs descendants. Ils pourraient servir pour l'évaluation du potentiel phœnicicole (qui souffre d'un manque de critères discriminants), pour l'analyse de la diversité génétique d'un grand nombre des cultivars femelles recensés dans les différents pays du Maghreb et pour assister des programmes de croisements dirigés dans la lutte contre le Bayoud (fusariose du palmier dattier).

Références

1. Ben Abdallah A. La phœniciculture. *Options Méditerranéennes*, 1990, Sér. A ; 11 : 105-20.
2. Djerbi M. *Précis de phœniciculture*. Tunis : FAO, 1995 ; 191 p.
3. Torres AM, Tisserat B. Leaf isozymes as genetic markers in date palms. *Am J Bot* 1980 ; 162-7.
4. Baaziz M, Saaïdi M. Preliminary identification of date palm cultivars by esterase isoenzymes and peroxidases activities. *Can J Bot* 1988 ; 66 : 89-93.
5. Bennaceur M, Lanaud C, Chevallier MH, Bou-naga N. Genetic diversity of the date palm from Algeria revealed by enzymes markers. *Plant Breeding* 1991 ; 107 : 56-69.
6. Bendiab K, Baaziz M, Brakez Z, Sedra MH. Correlation of isoenzyme polymorphism and Bayoud - disease resistant in date palm cultivars and progeny. *Euphytica* 1992 ; 65 : 23-32.
7. Letouzé R, Mercier L, Satour P, Daguin F, Lebrun JJ. La caractérisation des espèces végétales : application au palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). *Bulletin PNUD-FAO du Réseau maghrébin de recherche sur la phœniciculture et la protection du palmier dattier* 1991 ; 1 : 7-13.
8. BenSlimane A. La RFLP, un outil pour l'amélioration génétique du palmier dattier. In : FAO-PNUD, ed. *2^e Séminaire maghrébin sur la culture in vitro du palmier dattier*. Marrakech : Alwtan Press, Lebanon, 1989 : 125-7.
9. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990 ; 18 : 6531-5.
10. Khadari B, Lashermes P, Kjellberg F. Identification variétale et ressources génétiques chez le figuier (*Ficus carica* L.) : utilisation des marqueurs RAPD. In : Dubois J, Demarly Y, eds. *Quel avenir pour l'amélioration des plantes*. Paris : John Libbey Eurotext, 1995 : 399-412.
11. Isabel N, Tremblay L, Michaud M, Tremblay FM, Bousquet J. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.p. *Theor Appl Genet* 1993 ; 86 : 81-7.
12. Landry B, Li R, Cheung W, Granger R. Phylogeny analysis of 25 apple root stocks using RAPD markers and tactical gene tagging. *Theor Appl Genet* 1994 ; 89 : 847-52.
13. Collins CG, Symons RH. Polymorphisms in grapevine DNA detected by the RAPD-PCR technique. *Plant Mol Biol Rep* 1993 ; 11 : 105-12.
14. Shah FH, Rashid O, Simons AJ, Dunsdon A. The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Theor Appl Genet* 1994 ; 89 : 713-8.
15. Corniquel B, Mercier L. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar identification by RFLP and RAPD. *Plant Sci* 1994 ; 101 : 163-72.
16. Waugh R, Powell W. Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTECH* 1992 ; 10 : 186-91.
17. Chandelier A. *Structure du génome mitochondrial de l'épicéa commun (Picea abies (L.) Karst.) lors de l'embryogenèse somatique in vitro*. Thèse de doctorat, Gembloux : Faculté des Sciences agronomiques, 1995 ; 242 p.
18. Vroh BI, Harvengt L, Chandelier A, Mergéai G, du Jardin P. Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding* 1996 ; 115 : 205-6.
19. Wolff K, Schoen ED, Peters-vanrijn J. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in *Chrysanthemum*. *Theor Appl Genet* 1993 ; 86 : 1033-7.
20. Karp A, Issac PG, Ingram DS. *Molecular tools for screening biodiversity*. London : Chapman & Hall, 1998 : 181-213.