

Etude préliminaire de la diversité génétique du genre *Ananas* par les RFLPs.

J.L. NOYER

INTRODUCTION

Afin d'appuyer le programme d'amélioration variétale de l'ananas et d'avoir une bonne connaissance de la diversité du matériel végétal utilisé, des analyses de variabilité phénotypique et isoenzymatique ont été réalisées par Chantal CABOT (1988) et M.L. GARCIA (1988). La mise en oeuvre de techniques de biologie moléculaire (RFLPs : Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction) permet de disposer de nombreux marqueurs génétiques. L'étude de la diversité génétique par RFLPs se poursuit actuellement au laboratoire AGETROP à Montpellier. D'autres programmes au sein de l'IRFA sont déjà engagés dans cette voie, c'est le cas des agrumes (OLLITRAULT, 1990) et du bananier (LANAUD *et al.*, 1991).

MATERIEL ET METHODE

Matériel.

● Matériel végétal.

Soixante-quinze accessions issues de la collection du genre *Ananas* gérée par l'IRFA ont été étudiées.

Les accessions choisies permettent de disposer d'un ou de plusieurs échantillons des espèces définies par SMITH (1979). Au sein de l'espèce *comosus* les cinq cultivars (Cayenne, Queen, Red Spanish, Singapour Canning, Mordilona) sont représentés. Deux clones de *pseudananas* sont également introduits dans cette analyse.

Sur les 75 individus étudiés, 48 proviennent des prospections récentes effectuées au Vénézuéla (LEAL, 1987 ; CABOT, 1990). Leur classement dans l'un des groupes botaniques de SMITH est donc récent et susceptible, dans certains cas, d'être reconsidéré.

● Sondes utilisées.

Nous avons utilisé dans cette étude 11 sondes hétéro-

logues (issues d'autres organismes) dans la mesure où nous ne disposons pas au départ d'une banque de sondes d'ADN obtenues à partir d'un clone d'ananas. Ces sondes sont ainsi réparties :

- 5 sondes mitochondriales : ATPase subunit 6 (DEWEY *et al.*, 1985) ; ATPase subunit 9 (RECIPON, 1989) ; ATPase α -subunit (SCHUSTER et BRENNICKE, 1986) ; Cob (LEJEUNE, comm. pers.) ; COX subunit II (BONEN *et al.*, 1984)

- 2 sondes chloroplastiques : grande sous-unité de la rubisco (R. MACHE, com. pers.) ; cytochrome f (WILLEY *et al.*, 1984) ;

- 4 sondes nucléaires : ADH1 (GERLACH *et al.*, 1982) ; sondes nucléaires répétées de tabac 27/137 et 842/238 (DE PAEPE R., 1988, com. pers.) ; NADP specific glutamate dehydrogenase (J. FINCHAM, 1988, com. pers.).

Nous avons également utilisé comme sonde un ADN mitochondrial ainsi qu'un ADN chloroplastique d'ananas.

Les ADN totaux des clones étudiés ont été digérés séparément par huit enzymes de restriction, *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*R I, *Pst* I, *Sst* I, *Xho* I, *Hae* III, *Sac* I.

Méthode.

L'étude des RFLPs se divise en trois grandes étapes techniques :

- isolement de l'ADN mitochondrial, chloroplastique, nucléaire ou génomique total ;

- digestion de l'ADN par une enzyme de restriction suivie de la séparation des fragments obtenus par électrophorèse et leur transfert sur une membrane de nylon ;

- repérage de fragments spécifiques par des sondes marquées et autoradiographie.

- Isolement.

La méthode d'extraction utilisée pour l'ADN génomique total est dérivée de celle décrite par DELLAPORTA *et al.* (1983). Les rendements obtenus sont de l'ordre de 100 à 300 µg d'ADN pour 3 grammes de feuille fraîche. L'ADN de haut poids moléculaire ainsi obtenu (photo 1) est digérable par les enzymes de restriction (photo 2).

Quelques extractions d'ADN mitochondrial et chloroplastique ont été réalisées selon les méthodes décrites par RODE *et al.* (1985), modifiées par D'HONT *et al.* (1987).

- Digestion, séparation, transfert.

Après digestion par une enzyme de restriction, la technique de séparation utilisée est une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 p. 100 en immersion (photos 1 et 2). Après migration, le gel est mis en incubation dans un bain d'HCl 0,25 N, puis dans un bain de NaOH 0,4 N; l'ADN est ensuite transféré et fixé sur une membrane de nylon Hybond N⁺ (SOUTHERN, 1975).

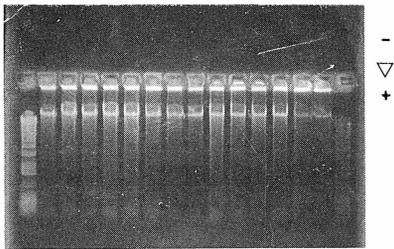


Photo 1 - ADN total non digéré après migration sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium (BET).

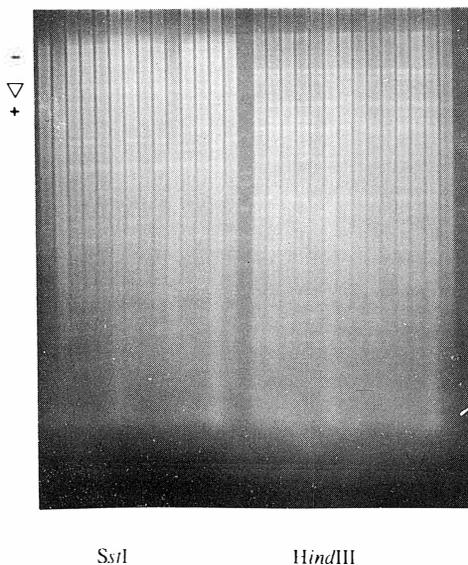


Photo 2 - ADN total digéré par *HindIII* ou *SstI* après séparation des fragments par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au BET.

- Hybridation et autoradiographie.

Les sondes sont marquées au ³²P à l'aide d'un kit de marquage (Amersham 1601 RPN Z) puis hybridées sur l'ADN transféré sur membranes. Les hybridations ainsi que les autoradiographies ont été réalisées selon le protocole décrit par BIOSEM.

Un tri préliminaire de couples enzyme-sonde a permis de définir les combinaisons polymorphes. On a recherché des profils polymorphes simples pour les analyses de diversité, des profils polymorphes comportant plus de bandes pour les études d'identification variétale.

RESULTATS

Hybridations avec des sondes nucléaires hétérologues.

Les 4 sondes nucléaires, couplées avec les huit enzymes de restriction utilisées ont présenté des profils de restriction monomorphes.

Hybridations avec des sondes mitochondriales hétérologues.

Sur les 40 combinaisons testées, seul le couple *HindIII*-*CoxII* a révélé du polymorphisme. Il a permis de définir deux «groupes cytoplasmiques» (tableau 1, photo 3). Les individus présentant une bande de poids moléculaire d'environ 7000 bp sont classés dans le groupe 1, ceux présentant une bande d'environ 3900 bp dans le groupe 2.

Hybridations avec des sondes chloroplastiques hétérologues.

Les deux sondes chloroplastiques n'ont pas permis de révéler de polymorphisme en association avec les enzymes de restriction utilisées.

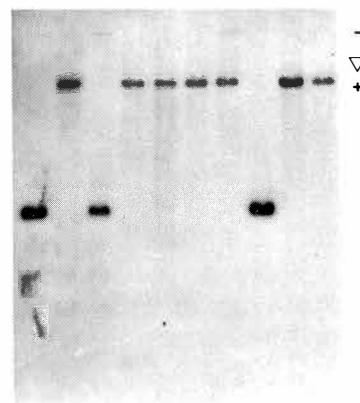


Photo 3 - Autoradiographie de profils de restriction polymorphes mis en évidence par le couple enzyme-sonde *HindIII*-*CoxII*.

TABEAU 1 - Répartition des 75 accessions dans les deux groupes cytoplasmiques définis par le couple enzyme-sonde *Hind*III-CoxII.

Cultivar	Espèce	Groupe	Cytoplasme	Cultivar	Espèce	Groupe	Cytoplasme
BR47	ananassoides		1	PE70	comosus	Mordilona	1
GU61	ananassoides		2	VE130	comosus	Mordilona	1
GU62	ananassoides		2	VE24	comosus	Mordilona	1
VE138	ananassoides		1	BR1	comosus	Pernambuco	1
VE25	ananassoides		1	VE16	comosus	Pernambuco	1
VE79	ananassoides		1	VE18	comosus	Pernambuco	1
VE80	ananassoides		1	VE58	comosus	Pernambuco	1
BR20	bracteatus		1	VE93	comosus	Pernambuco	1
CI99	bracteatus		1	GU76	comosus	Queen	1
BR138	comosus		1	RE43	comosus	Queen	1
CR8	comosus	indéterminé	1	RE83	comosus	Queen	1
TW12	comosus	indéterminé	1	TA39	comosus	Queen	1
VE1	comosus	indéterminé	1	SI85	comosus	Singapour canning	1
VE3	comosus	indéterminé	1	GU71	comosus	Red spanish	1
VE6	comosus	indéterminé	1	GU75	comosus	Red spanish	1
VE11	comosus	indéterminé	1	VE21	comosus	Red spanish	1
VE17	comosus	indéterminé	1	VE22	comosus	Red spanish	1
VE27	comosus	indéterminé	1	VE61	comosus	Red spanish	1
VE29	comosus	indéterminé	1	VE62	comosus	Red spanish	2
VE45	comosus	indéterminé	1	VE67	comosus	Red spanish	2
VE46	comosus	indéterminé	1	VE68	comosus	Red spanish	1
VE49	comosus	indéterminé	1	VE72	comosus	Red spanish	1
VE56	comosus	indéterminé	1	VE74	comosus	Red spanish	1
VE57b	comosus	indéterminé	1	BR67	lucidus		2
VE60	comosus	indéterminé	2	VE28	lucidus		2
VE63	comosus	indéterminé	1	CI33	nanus		2
VE71	comosus	indéterminé	1	VE117	parguazensis		2
VE75	comosus	indéterminé	1	VE131	parguazensis		2
AN38	comosus	Cayenne	1	VE135	parguazensis		2
VE128	comosus	Cayenne	2	VE144	parguazensis		2
VE69	comosus	Cayenne	1	VE64	parguazensis		1
VE70	comosus	Cayenne	1	VE66	parguazensis		2
HA27	comosus	Cayenne	1	VE76	parguazensis		1
BR50	comosus	Mordilona	1	VE77	parguazensis		2
CO42	comosus	Mordilona	1	VE78	parguazensis		2
MR42	comosus	Mordilona	1	VE8	parguazensis		2
PE53	comosus	Mordilona	1	BR170	pseudananas		2
				BR81	pseudananas		2

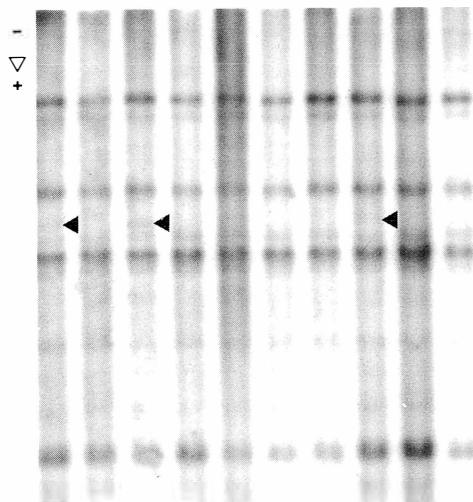


Photo 4 - Autoradiographie de profils de restriction polymorphes mis en évidence après hybridation d'ADN mitochondrial sur des ADN totaux digérés par *Hind*III.

Hybridation avec de l'ADN mitochondrial total d'ananas.

Après purification, l'ADN mitochondrial a été hybridé sur des ADN totaux digérés par *Hind*III. Un polymorphisme à deux profils a été mis en évidence avec cette méthode (photo 4). Les variations observées définissent deux groupes identiques à ceux obtenus avec la sonde COX II. Cette technique n'a pas été retenue, le bruit de fond toujours important rendant plus difficile la lecture des profils de restriction révélés que pour une hybridation avec COX II.

Hybridation avec de l'ADN chloroplastique total d'ananas.

Des hybridations ont été réalisées sur des ADN totaux digérés par *Hind*III, *Bam*HI, *Sst*I et *Xho*I. Les profils de restriction obtenus sont lisibles. Un grand nombre de bandes a été mis en évidence avec ces quatre enzymes. Malgré cela seul l'individu VE78 est différencié dans les 75 accessions étudiées.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Cette étude préliminaire a permis de mettre au point les techniques RFLPs appliquées au genre *Ananas*. Au total onze sondes hétérologues et deux sondes homologues ont été hybridées sur 75 individus digérés par huit enzymes de restriction. Ces 75 individus représentent les principales classes définies par SMITH. Les informations sur la diversité de l'ADN nucléaire ne sont pas encore exploitables, en regard du petit nombre de sondes étudiées par rapport à la taille du génome nucléaire. Les premières informations sont apportées sur la diversité de l'ADN cytoplasmique.

Le polymorphisme observé avec la sonde hétérologue COX II ou avec l'ADN mitochondrial homologue utilisé comme sonde sur des ADN totaux digérés par *Hind*III permet de définir deux classes d'individus. On notera que les individus appartenant aux espèces *ananassoides*, *bracteatus* et *comosus* se retrouvent majoritairement dans le groupe 1. *Lucidus*, *nanus* et *paraguayensis* sont à deux exceptions près dans le groupe 2 où l'on retrouve également les deux *pseudananas*. On peut se demander si une analyse

approfondie des origines géographiques réelles des cultivars introduits dans cette étude ne permettrait pas d'identifier des origines différentes pour ces deux groupes. Les premières analyses faites sur du matériel végétal issu de prospections faites au Vénézuéla semblent en effet montrer une partition le long du Rio Orinoco. Il sera utile de compléter cet échantillonnage initial par la totalité des accessions restantes dont nous disposons afin de vérifier cette hypothèse.

L'observation d'un nombre restreint de profils polymorphes lors des hybridations d'ADN mitochondriaux ou chloroplastiques sur des ADN totaux semble montrer une faible diversité génétique cytoplasmique. Toutefois, l'analyse du polymorphisme de l'ADN cytoplasmique sera poursuivie afin d'essayer de mieux connaître les phylogénies maternelles du genre *Ananas*.

Par ailleurs, poursuivant cette étude préliminaire, d'autres outils seront mis en oeuvre pour évaluer la variabilité des espèces d'ananas au niveau de l'ADN nucléaire.

BIBLIOGRAPHIE

- BONEN (L.), POPPO (H.), GRAY (B.) and GRAY (M.W.). 1984.
The wheat cytochrome oxidase subunit II gene has an intron insert and three radical amino acid changes relative to maize.
The EMBO Journal, 3 (11), 2531-2536.
- CABOT (Chantal). 1988.
Amélioration génétique de l'ananas : exemple de création variétale, analyse des ressources génétiques.
Thèse, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, 193 p.
- DELLAPORTA (S.L.), WOOD (J.) and HICKS (J.B.). 1983.
A plant DNA miniprep - version II.
Plant Mol. Biol. Rep., 1, 19-21.
- DEWEY (R.E.), LEVINGS III (C.S.) and TIMOTHY (D.H.). 1985.
Nucleotide sequence of ATPase subunit 6 gene of maize mitochondria.
Plant. Physiol., 79, 914-919.
- D'HONT (A.), QUETIER (F.), TEOLE (E.) and DATTE (Y.). 1987.
Mitochondrial and chloroplast DNA analysis of interspecific somatic hybrids of a leguminosae : *Medicago* (alfalfa).
Plant Science, 53, 237-242.
- GARCIA (M.L.). 1988.
Etude taxonomique du genre *Ananas*. Utilisation de la variabilité enzymatique.
Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Thèse, 156 p.
- GERLACH (W.L.), PRYOR (A.J.), DENNIS (E.S.), FERL (R.J.), SACHS (M.M.) and PEACOCK (J.). 1982.
cDNA cloning and induction of the alcohol dehydrogenase gene (*Adhl*) of maize.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2981-2985.
- LANAUD (C.), TEZENAS DU MONTCEL (H.), JOLIVOT (M.P.), GLASZMANN (J.C.) and GONZALEZ DE LEON (D.). 1991.
Variation of ribosomal gene spacer length among wild and cultivated banana.
Heredity (in press).
- LEAL (F.). 1987.
Prospecciones de piña (*Ananas comosus*) en Venezuela durante los años de 1985-1986.
Fruits, 42 (3), 145-148.
- LOISON-CABOT (Chantal). 1990.
Prospection sur l'ananas au Vénézuéla.
Fruits, 45 (3), 251-263.
- OLLITRAULT (P.). 1990.
Isozymes and DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) as genetic markers in Citrus selection.
Proceedings of the 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation. Chiang Mai, Thailand, 4-10th Feb. 1990.
B. AUBERT, S. TONTYAPORN and D. BUANGSUWON (Eds), 57-66.
- RECIPON (H.). 1989.
Contribution à l'étude des gènes mitochondriaux codant pour des sous-unités du complexe ATPsynthase dans un couple isogénique mâle-fertile mâle-stérile du tournesol (*Helianthus annuus*L.).
Thèse, Université Paris XI, Orsay, 157 p.
- RODE (A.), HARTMANN (C.), DRON (M.), PICARD (E.) and QUETIER (F.). 1985.
Organelle genome stability in anther-derived doubled haploids of wheat.
Theor. Appl. Genet., 71, 320-324.
- SCHUSTER (W.) and BRENNICKE (A.). 1986.
Pseudocopies of the ATPase α -subunit gene in *Oenothera* mitochondria are present on different circular molecules.
Mol. Gen. Genet., 204, 29-35.
- SMITH (L.B.). 1979.
Ananas comosus L. Merr.
in Flora Neotropica, 14, part. 3, 2048-2064.
- SOUTHERN (E.). 1975.
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis.
J. Mol. Biol., 98, 503-517.
- WILLEY (D.L.), AUFFRET (A.D.) and GRAY (J.C.). 1984.
Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes.
Cell, 36, 555-562.