

Rôle des interactions nucléocytoplasmiques dans la résistance du palmier dattier au bayoud

M. Triffi¹ C. Hartmann⁴
A. Benslimane² A. Rode⁴
A. Rhouma³ M. Marrakchi¹

Introduction

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une monocotylédone pérenne qui constitue le pivot de l'agrosystème oasien des régions sahariennes et sub-sahariennes. Son utilisation dans les principales zones phoénicoles de l'Afrique du Nord et Moyen Orient consiste en l'exploitation de variétés et d'écotypes adaptés aux conditions locales. Sa présence dans les zones désertiques marginalisées témoigne de ses grandes potentialités adaptatives aux conditions climatiques extrêmes où il contribue à maintenir un milieu favorable aussi bien à la vie de l'homme qu'à celle du bétail. En effet,

¹ Laboratoire de Génétique moléculaire, immunologie et biotechnologie, faculté des Sciences de Tunis, 2092 El Manar, Tunis, Tunisie.

² Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc.

³ Centre de recherches phoénicoles, Inrat, Degache, Tunisie.

⁴ Laboratoire BMV III, IBP, Bat 630, UPSud, 91405 Orsay, France.

Le palmier est essentiellement cultivé pour la production de dattes qui représentent la principale source agricole des oasiens et constitue de ce fait la clé de leur sécurité alimentaire. À ce sujet, environ 10 % de la population tunisienne dépend de la phoéniculture et des cultures vivrières oasiennes. De même, en jouant le rôle d'un écran protecteur contre l'ensoleillement, le palmier dattier permet le maintien des cultures oasiennes sous-jacentes caractérisées par une grande diversité. En Tunisie, la phoéniculture est la base incontournable qui assure la stabilité socio-économique des écosystèmes oasiens. Toutefois, pour répondre à des critères de commercialisation et en dépit de sa richesse considérable, cette culture s'oriente dangereusement vers la réduction du nombre de variétés cultivées (Rhouma, 1994). À titre indicatif, Rhouma (1996) rapporte que la variété Deglet Nour représente à elle seule environ 70 % de l'effectif des palmiers tunisiens pour atteindre le taux de 90 % dans certaines palmeraies dont celles de Nefzaoua et de Régim Maatoug. Ceci montre la tendance vers une culture monovariétale.

En outre, le palmier dattier est inexorablement menacé par des agents pathogènes qui sont à l'origine de plusieurs maladies dont la fusariose ou « bayoud ». Cette maladie, probablement d'origine marocaine (Djerbi *et al.*, 1985) a rapidement progressé vers l'Est algérien tout en décimant sur son passage plusieurs millions de plantes dont 11 millions au Maroc (Haddouch, 1996). Ces deux facteurs font que le patrimoine génétique phoénicole tunisien évolue vers une érosion génétique et par conséquent le déséquilibre de l'environnement oasien. Il en résulte que les palmeraies tunisiennes sont constamment menacées. Si les précautions nécessaires ne sont pas prises, cette situation sera lourde de conséquences aussi bien dans la dégradation de l'agrosystème que pour la sécurité alimentaire.

Tenant compte de ces considérations, l'élaboration d'une stratégie de lutte préventive visant la sauvegarde et la conservation de ce patrimoine s'avère impérative. Ainsi, l'établissement d'un programme d'amélioration des variétés ancestrales sélectionnées et la recherche de phénotypes intéressants tant par leur qualité dattière que par leur résistance à certaines maladies au caractère épidémique constitue une priorité en Afrique du Nord. Dans ce cadre, la mise en œuvre d'une expérimentation basée sur la recherche de marqueurs moléculaires liés à la résistance du palmier aux diverses maladies

serait d'un apport certain dans la réalisation efficace de ce programme. À ce sujet, des travaux ont permis de montrer que les mitochondries du palmier dattier hébergent des plasmides circulaires qui constituent des marqueurs potentiels liés à la résistance au bayoud (Benslimane *et al.*, 1994 ; Benslimane, 1995 ; Trifi *et al.*, 1997). En effet, ces molécules appelés R et S ont été mises en évidence respectivement chez les plantes résistantes et sensibles à la fusariose. Il serait donc intéressant de préciser la nature de la corrélation qui existe entre le polymorphisme de ces plasmides et le phénotype de la plante vis à vis de l'agent pathogène « tolérance ou sensibilité ».

Par ailleurs, l'utilisation de la technique de polymérisation enzymatique en chaîne « PCR » mise au point par Saiki *et al.* (1988) permet facilement la détection de ces plasmides. En effet, grâce à une paire appropriée d'oligonucléotides, il est possible de générer, à partir d'un extrait d'ADN cellulaire total de palmier, des amplificateurs correspondant à chaque type de plasmide présent (Bouachrine, 1997 ; Trifi *et al.*, 1997).

Dans le présent travail, nous présentons les résultats de l'analyse des profils plasmidiques chez des variétés tunisiennes de palmier dattier choisies pour leur comportement à l'égard de la fusariose. Un modèle basé sur les interactions nucléocytoplasmiques est présenté afin de rendre compte de la variabilité des plasmides mitochondriaux en relation avec la résistance ou la sensibilité de cette espèce à l'agent pathogène.

■ Matériel et méthodes

Matériel biologique

Au cours de cette étude, nous avons utilisé les variétés tunisiennes de palmier dattier décrites dans le tableau 1 et qui ont été préalablement testées au Maroc en présence du champignon *Fusarium oxysporum* fsp *albedinis* (Saaidi, 1992 ; Sedra, 1992). Le matériel végétal, constitué de jeunes palmes prélevées sur des pieds adultes,

provient de la collection du Centre de recherches phoénicoles, Inrat, Degache situé dans le sud tunisien.

Variété ¹	Origine	Qualité	Phénotype ²	Plasmide
Deglet Nour	Degache	Excellente	Sensible	R
Ftimi	Djerid	Très bonne	Sensible	S
Khou Ftimi	Djerid	Bonne	Sensible	S
Kenta	Djerid	Très bonne	Sensible	S
Kintichi	Djerid	Très appréciée	Sensible	S
Boufagous	Tozeur	Très bonne	Sensible	S
Horra	Djerid	Parfumée	Sensible	R/S
Goundi	Tozeur	Très bonne	Sensible	S
Besser Hlou	Degache	Assez bonne	Sensible	S

■ Tableau 1

Variétés tunisiennes de palmier dattier utilisées.

¹ : Appellation selon Rhouma (1994) ;

² : phénotype d'après Saaidi (1992) et Sedra (1992).

Extraction de l'ADN

L'ADN cellulaire total est extrait selon le protocole de Dellaporta *et al.* (1984) à partir des jeunes palmes préalablement congelées dans de l'azote liquide. Après purification, les ADNs sont quantifiés et leur qualité est testée grâce à une migration électrophorétique sur un mini-gel selon la méthode de Sambrook *et al.* (1989).

Réaction de polymérisation enzymatique en chaîne (PCR)

Au cours de cette expérimentation, nous avons utilisé une paire d'oligonucléotides permettant de générer spécifiquement des amplificateurs correspondant aux plasmides mitochondriaux du palmier dattier (Bouachrine, 1997 ; Trifi *et al.*, 1997). Ces oligonucléotides présentent les séquences suivantes :

O1 : 5'CCTTATACCAGTCGTGCTT 3'

O2 : 5'AAGGCAGATATAATCGGA 3'

Chaque réaction est réalisée dans un volume total de 25 μL composé de : 500 ng d'ADN cellulaire total ; 2,5 μL de tampon de l'enzyme (10X) ; 1,5 U de Taq DNA polymérase ; 200 μM de chaque dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) et 50 pM de chaque amorce. Afin d'éviter l'évaporation du milieu réactionnel, une goutte d'huile minérale est additionnée à chaque tube. L'amplification est conduite dans un thermocycleur programmé pour effectuer les conditions suivantes : une dénaturation préalable pendant 10 mn suivie de 35 cycles. Chaque cycle comprend les trois étapes suivantes : 30 s à 94 °C pour la dénaturation ; 2 mn à 48 °C pour l'hybridation des amorces et 2 mn à 72 °C pour la synthèse. Une prolongation de 10 mn à 72 °C a été toujours programmée à la fin du dernier cycle.

Les amplifications sont standardisées en utilisant les témoins suivants : deux témoins négatifs correspondant au mélange réactionnel ne contenant pas d'ADN ou d'enzyme et deux témoins positifs contenant chacun de l'ADN plasmidique recombinant R ou S (Ben-slimane, 1995).

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,4 % et visualisés sous une lumière ultraviolette en présence de bromure d'éthidium (Sambrook *et al.*, 1989).

■ Résultats et discussion

Au cours d'une étude antérieure, nous avons pu montrer que la technique de polymérisation enzymatique en chaîne constitue une autre approche qui permet de générer des amplimères correspondant aux plasmides recherchés (Trifi *et al.*, 1997). Sur cette base, nous avons conduit une expérimentation utilisant la technique de la PCR afin de rechercher les plasmides hébergés par les mitochondries du palmier dattier. Ainsi de l'ADN cellulaire total extrait à partir de chacune des variétés décrites précédemment est utilisé comme matrice pour amplifier les séquences cibles R et S. La figure 1 représente les produits d'amplification typiques obtenus à partir des variétés testées.

Figure 1
Exemples typiques d'amplimères
issus de l'ADN cellulaire total
extrait à partir des variétés
tunisiennes de palmier dattier.



M : marqueur de poids moléculaire (1 kb Ladder) ; T : contrôles standards ; Variétés présentant exclusivement le plasmide S (pistes 1-3, 5-7 et 9) ou le plasmide R (piste 4) ; Variété présentant simultanément les deux formes plasmidiques (piste 8). La taille des bandes est exprimée en paire de nucléotides.

L'analyse de cette figure montre clairement que ces variétés présentent des profils plasmidiques différents et qu'elles peuvent être regroupées en trois classes :

- la première est caractérisée par des mitochondries qui hébergent le plasmide S. Dans cette catégorie, on rencontre les variétés : Boufagous, Ftimi, Khou Ftimi, Kenta, Kintichi, Goundi et Besser Hlou ;
- la deuxième comporte la variété Deglet Nour dont les mitochondries montrent la présence exclusive des plasmides R ;
- la troisième comprend la variété Horra. Cette classe se distingue des autres par la présence simultanée des deux formes plasmidiques R et S.

Par ailleurs, la confrontation de l'analyse de l'équipement plasmidique de chaque variété avec son comportement résistant ou sensible à l'agent pathogène (Saaidi, 1992 ; Sedra, 1992) montre que, dans l'ensemble, ces plasmides mitochondriaux constituent de bons marqueurs du comportement du palmier au bayoud (tabl. 1). En effet, ce tableau nous indique que parmi les 9 variétés testées, 7 sont sensibles au champignon et hébergent uniquement le plasmide S.

Néanmoins, il en ressort une ambiguïté puisqu'en dépit de leur sensibilité au champignon, les variétés Deglet Nour et Horra possèdent des profils plasmidiques caractérisées respectivement par la présence exclusive de la forme R et celle des deux formes plasmides S et R.

Les explications suivantes pourraient être prises en considération pour rendre compte au moins en partie du comportement particulier de ces deux variétés :

– la résistance du palmier dattier au champignon n'a pas un déterminisme simple et serait sous un contrôle multigénique. D'ailleurs, l'existence de variétés présentant un comportement intermédiaire entre celles qui sont complètement résistantes et celles totalement sensibles au bayoud (Saaidi, 1992 ; Sedra, 1992) est en faveur de l'hypothèse impliquant plusieurs gènes dans le contrôle de la résistance. Il semble donc que cette dernière est au moins en partie adaptative comme le montre la persistance de quelques palmiers appartenant à la variété Deglet Nour (~17 %) transplantés dans des champs « bayoudés » du Maroc après plusieurs années d'observations (Saaidi, 1992) ;

– la présence des plasmides mitochondriaux serait une condition nécessaire mais non suffisante pour l'expression de la résistance. Ceci se traduit par le fait que ces molécules ne sont pas nécessairement impliquées dans la contribution du phénotype de la plante vis à vis de l'agent pathogène. Ainsi, selon les gènes impliqués dans l'acquisition de la résistance, les plasmides R et/ou S pourraient être considérés comme étant des marqueurs phénotypiques de la maladie.

Quoiqu'il en soit, ces résultats nous ont amenés à proposer un modèle permettant de rendre compte des différents profils plasmidiques mitochondriaux du palmier dattier en relation avec la résistance/sensibilité au champignon. Ce modèle est basé sur les interactions nucléocytoplasmiques. En effet, en plus des propriétés recombino-gènes des plasmides mitochondriaux, le modèle proposé implique l'intervention d'au moins deux gènes nucléaires chacun à deux allèles : le premier, impliqué dans l'expression de la résistance est noté « R/r », avec dominance de l'allèle R sur l'allèle r ($R > r$). Les allèles R et r correspondent respectivement aux phénotypes résistant et sensible ; le second, impliqué dans le contrôle de la recombinaison plasmidique est désigné « Rec/rec » avec dominance de l'allèle Rec sur l'allèle rec sachant que Rec et rec correspondent aux phénotypes aptitude et inaptitude à recombiner. Rappelons que les propriétés recombino-gènes des plasmides mitochondriaux ont été mises en évidence grâce à l'existence de séquences répétées directes (Arganoza et Akins, 1995 ; Benslimane

et al., 1996) et que les interactions nucléocytoplasmiques ont été rapportées par plusieurs auteurs (Mackenzie et Basset, 1987 ; Hartmann *et al.*, 1992 ; Flammand *et al.*, 1993). Tenant compte de ce modèle, la présence des plasmides S et/ou R dans les mitochondries des variétés sensibles s'expliquerait au moins en partie par les génotypes suivants.

1) Une plante à l'état homozygote récessif pour les deux gènes nucléaires et dont les mitochondries hébergent le plasmide S aura un phénotype sensible à la fusariose et des plasmides S incapables de recombiner. Cette situation a été observée dans 7 cas sur 9 « i.e. les variétés Boufagous, Ftimi, Khou Ftimi, Kenta, Kintichi, Goundi et Besser Hlou ».

2) Par contre, un palmier homozygote récessif pour le gène « R/r » qui possède au moins un allèle dominant Rec est sensible à la maladie tout en ayant des plasmides R qui résultent de la forme plasmidique S par recombinaison. C'est probablement le cas de la variété Deglet Nour qui est caractérisée par sa sensibilité à l'agent pathogène tout en possédant des mitochondries qui hébergent le plasmide R. De même, l'hypothèse d'une homozygotie récessive pour le gène « r/r » en présence d'un cytoplasme comportant des mitochondries ayant fixé le plasmide R n'est pas à exclure.

3) Pour la variété Horra qui est de phénotype sensible à l'agent pathogène et dont les mitochondries présentent simultanément les deux formes plasmidiques R et S, on peut admettre l'une des trois hypothèses suivantes :

– elle est à l'état homozygote récessif aussi bien pour le gène « R/r » que pour (Rec/rec). Cependant, elle aurait un cytoplasme constitué d'une chimère de mitochondries ayant chacune l'un des plasmides R ou S. D'où le phénotype sensible à la fusariose et présence simultanée des plasmides R et S (tabl. 2) ;

– une plante Horra est à l'état homozygote récessive pour le gène « R/r » et possède au moins un allèle dominant Rec. Dans ce cas, son cytoplasme comporte une chimère de mitochondries : les unes hébergeant des plasmides S ayant gardé leurs potentialités recombinogènes intactes ; les autres présentent des plasmides S dont la séquence est caractérisée par des mutations empêchant totalement la recombinaison (tabl. 2). À ce sujet, des études ont montré que les

séquences répétées directes ne constituent pas obligatoirement des sites de recombinaisons, mais la présence d'autres petites séquences appelées « sites spécifiques » seraient vraisemblablement indispensables pour que l'événement de recombinaison puisse avoir lieu (Makaroff et Palmer, 1988 ; Wahleithner et Wolstenholme, 1987 ; Hanson et Folkerts, 1992) ;

– les palmiers appartenant à cette variété sont homozygotes récessifs pour le gène « R/r » et possèdent au moins un allèle dominant Rec. Dans ce cas, la recombinaison doit se faire aussi bien au niveau intramoléculaire, grâce au jeu de séquences répétées directes du plasmide S, qu'au niveau intermoléculaire par l'intermédiaire du plasmide R et du fragment de taille 109 pb. Il est évident que, dans ce cas, la molécule subgénomique et non autorépliquative doit être maintenue au moins pendant quelques divisions cellulaires (tabl. 2).

Hypothèse	Génotype		Phénotype
	Noyau R/r Rec/rec	Mitochondire R/S	
H1	r/r rec/rec	Chimère R et S	Sensible
H2	r/r Rec/?	Chimère S + et S muté	Sensible
H3	r/r Rec/?	Equilibre R et S	Sensible

Tableau 2

Résumé des hypothèses explicatives du comportement de la variété Horra.

Quoiqu'il en soit, à la lumière de ces résultats il semble clairement que les plasmides mitochondriaux du palmier dattier possèdent des propriétés recombino-gènes qui semblent être sous le contrôle du génome nucléaire.

Conclusions

Ce travail montre les résultats de l'analyse du polymorphisme des plasmides mitochondriaux chez des variétés tunisiennes de palmier

dattier. Il en ressort que les variétés testées dont le phénotype à l'égard de la fusariose est connu, peuvent être classées en deux catégories : celles dont les mitochondries hébergent exclusivement l'un des deux plasmides S ou R ; et celles dont les mitochondries présentent simultanément les deux formes plasmidiques.

Afin de rendre compte de la variabilité de ces molécules en relation avec le comportement de cette espèce vis à vis de l'agent pathogène, un modèle basé sur les interactions nucléocytoplasmiques et faisant intervenir des gènes nucléaires a été présenté. Dans ce contexte, des hypothèses ont été avancées pour expliquer les déviations de la corrélation qui existent entre le phénotype du palmier à l'égard du bayoud et la nature du plasmide présent dans les mitochondries. Quoiqu'il en soit, il apparaît que ces molécules constituent des marqueurs moléculaires de la résistance à la fusariose. La mise à profit de ces marqueurs serait d'une opportunité certaine aussi bien dans l'élaboration de programmes visant la sélection de clones ayant des traits agronomiques intéressants que dans la sauvegarde des variétés ancestrales.

Remerciements

Ce travail a été financé par la Direction générale de la recherche scientifique et technique (ministère de l'Enseignement supérieur), le Secrétariat d'État à la recherche scientifique et à la technologie, l'Institut français de coopération « Projet 96/F0911 » (ambassade de France en Tunisie).

Bibliographie

Arganoza MT, Akins RA 1995 — Recombinant mitochondrial plasmids in *Neurospora* composed of Varkud and a new multimeric mitochondrial plasmid. *Curr Genet.*, 29 : 34-43.

Benslimane AA, Hartmann C, Ouenzar B, Rode A 1996 — Intramolecular recombination of a mitochondrial minicircular plasmide-like DNA of a date-palm

mediated by a set of short direct-repeat sequences. *Curr. Genet.*, 29 : 591-593.

Benslimane AA, Rode A, Quetier F, Hartmann C 1994 — Characterization of two minicircular plasmide-like DNAs isolated from date-palm mitochondria. *Curr. Genet.*, 26 : 535-541.

- Benslimane AA, 1995 —
Plasmides mitochondriaux du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Mise en évidence et caractérisation moléculaire. Thèse de doctorat d'Etat, université Cadi Aayed, faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc, 219 p.
- Bouachrine B 1997 —
Distribution des plasmides mitochondriaux R et S chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Mise au point d'une technique de détection par PCR. Thèse de 3^e cycle, université Cadi Ayyad, faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, Maroc, 166 p.
- Dellaporta SL,
Wood J, Hicks JB, 1984 —
Maize DNA miniprep. In Molecular Biology of Plants. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, New York, 36-38.
- Djerbi M, Sedra My H,
El Idrissi-Ammari A 1985 —
Caractéristiques culturales et identification du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud. Ann. Inst. Nat. Rech. Agron. Tunis, 58 : 1-8.
- Flamand M C, Duc G,
Goblet JP, Hong L, Louis O,
Briquet M, Boutry M 1993 —
Variant mitochondrial plasmids of broad bean arose by recombination and are controlled by the nuclear genome. Nucl. Acids Res., 21 : 5468-5473.
- Haddouch M 1996 —
Situation actuelle et perspectives de développement du palmier dattier au Maroc. Options méditerranéennes, 28 : 63-79.
- Hanson MR, Folkerts O 1992 —
Structure and fonction of higher plant mitochondrial genome. Annual Review of Cytology, 141 : 129-172.
- Hartmann C, De Buyser J,
Morere Le Paven MC,
Dyer TA, Rode A 1992 —
Nuclear genes control changes in the organization of the mitochondrial genome in tissue cultures derived from immature embryos of wheat. Curr. Genet., 21 : 515-520.
- Mackenzie SA, Basset MJ 1987 —
Genetics of fertility restoration in cytoplasmic male-sterile *Phaseolus vulgaris*. Cytoplasmic alteration by a nuclear restorer gene. Theor. Appl. Genet., 74 : 642-645.
- Makaroff CA, Palmer JD 1988 —
Mitochondrial DNA rearrangements and transcriptional alterations in the male-sterile cytoplasm of Ogura radish. Mol., Cell., Biol., 8 : 1474-1480.
- Rhouma A 1994 —
Le palmier dattier en Tunisie. I. Le patrimoine génétique. Arabesques Editions et Créations, Tunis, Tunisie, 254 p.
- Rhouma A 1996 —
Le palmier dattier en Tunisie : un secteur en pleine expansion. Options méditerranéennes, série A 85-103.
- Saaïdi M 1992 —
Comportement au champ de 32 cultivars de palmier dattier vis-à-vis du bayoud : 25 années d'observations. Agronomie, 12 : 359-370.
- Saiki RK, Scharf S, Mullis KB,
Horn GT, Ehrlich HA, Amheim N 1988 —
Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 239 : 1350-1354.
- Sambrook J, Fritsch EF,
Maniatis T 1989 —
Molecular cloning: a laboratory manual. 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sedra MyH 1992 —
Evaluation and selection of cultivars
and clones of date-palm for
resistance to the bayoud-disease.
Arab J. Plant Prot., 10 (2) : 155-160.

Trifi M, Benslimane AA, Rhouma A,
Marrakchi M, Rode A 1997 —
Typage moléculaire de variétés
tunisiennes de palmier dattier
en relation avec la résistance
au bayoud. In : Actualité scientifique,
actes des 6^e Journées scientifiques

du réseau Aupelf/Uref
« Biotechnologies végétales :
génie génétique des plantes »,
université Paris Sud, Orsay,
30-3 juillet 1997, 299-306.

Wahleithner J A,
Wolstenholme DR 1987 —
Mitochondrial plasmids DNAs of
broad bean: nucleotide sequences,
complex secondary structures and
transcription. Curr Genet, 12 : 55-67.