

# Diversité génétique révélée par des marqueurs AFLP entre populations d'*Hedysarum coronarium* L.

S. Marghali, S. Ghariani,  
M. Marrakchi, N. Trifi-Farah

Parmi les légumineuses, les espèces du genre *Hedysarum* constituent un patrimoine phytogénétique performant pour la production de fourrage et la valorisation des parcours dégradés, notamment dans les régions semi-arides et arides. La conservation de ces ressources nécessite une évaluation préalable de leur diversité génétique.

## RÉSUMÉ

L'analyse moléculaire par AFLP de 10 populations spontanées et 2 cultivées de l'espèce *H. coronarium* L., a permis de recenser un total de 207 bandes dont 178 se sont révélées polymorphes, qui constituent des marqueurs puissants pour décrire la variabilité chez *H. coronarium*. La variabilité génétique est importante (taux de bandes polymorphes de 86% pour l'ensemble des populations analysées). La diversité génétique intrapopulation représente la majeure partie de la diversité génétique totale. Les distances génétiques établies à partir des données AFLP montrent la ressemblance des deux cultivars provenant de la région de Béja et de Mateur, et leur éloignement des populations spontanées Zit et Makthar à tendance orthotropique. Le cultivar Béja présente une relative proximité avec la population spontanée de la même localité.

## MOTS CLÉS

Cultivar, *Hedysarum coronarium*, population naturelle, ressources génétiques, Tunisie, variabilité génétique, zone méditerranéenne.

## KEY-WORDS

Cultivar, genetic resources, genetic variation, *Hedysarum coronarium*, Mediterranean region, natural population, Tunisia.

## AUTEURS

Laboratoire de Génétique Moléculaire, Immunologie et Biotechnologie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus universitaire, 2092 El Manar, Tunis (Tunisie) ; neila.trifi@fst.rnu.tn

## Introduction

Le genre *Hedysarum*, appartenant à la famille des Fabacées, renferme des espèces soit du groupe alpin, arctique et asiatique (2 n = 14), soit du groupe méditerranéen (2 n = 16) (POTTIER-ALAPETITE, 1979 ; BAATOUT *et al.*, 1990). Les espèces méditerranéennes couvrent une large aire de répartition allant de l'étage humide au saharien supérieur.

En Tunisie, les zones pastorales, et particulièrement celles situées dans les régions arides et semi-arides, sont fréquemment endommagées par une forte érosion génétique due essentiellement au surpâturage et aux précipitations irrégulières. Dans ce contexte, **les espèces du genre *Hedysarum* constituent un important patrimoine phytogénétique**, performant pour la valorisation des parcours dégradés et pour la production de fourrage (ABDELGUERFI-BERREKIA et ABDELGUERFI, 1986 ; BOUSSAID *et al.*, 1995). Le genre *Hedysarum* est représenté en Tunisie par les espèces du groupe méditerranéen *H. carnosum* Desf., *H. coronarium* L., *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* L. ssp *capitatum* Desf. Asch et Gr., et *H. spinosissimum* ssp *euspinosissimum* Briquet. Plusieurs prospections ont permis le recensement, la caractérisation ainsi que la détermination de l'aire de distribution des différentes espèces dans le bassin méditerranéen (TRIFI-FARAH *et al.*, 2002).

### ■ Intérêt de *Hedysarum coronarium* en Tunisie

Dans le présent travail, notre intérêt porte essentiellement sur l'espèce *H. coronarium*, appelée couramment sulla ou sainfoin d'Espagne, cultivée dans les pays méditerranéens tels que la Grèce, l'Espagne, l'Italie, la Tunisie, la Turquie et dans quelques zones d'Australie (LE HOUEROU, 1969 ; KRISHNA *et al.*, 1990 ; BULLITA *et al.*, 2000). Cette espèce diploïde (x = 8) a fait l'objet de domestication et d'améliorations, initialement en Italie à partir de la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle (ZANINI et BALLATORE, 1950 ; RESTUCCIA, 1976). La **valeur nutritive** du sulla est **comparable à celle de la luzerne et du trèfle violet** (CENNI *et al.*, 1968 ; BARRY, 1998). En Tunisie, certains cultivars sélectionnés (essentiellement la variété Grimaldi), d'origine italienne, ont été introduits et sont exploités sporadiquement pour la production de fourrage et pour l'amélioration des parcours.

Néanmoins, **en Tunisie, la culture du sulla reste très limitée** (elle ne concerne que quelques milliers d'hectares situés au nord du pays) au profit d'autres espèces fourragères à usage intensif dont le trèfle violet et la luzerne. En effet, malgré l'orthotropie accentuée des cultivars qui facilite leur exploitation, la récolte par ensilage ou en foin est difficile à cause de l'épaisseur des tiges. En revanche, **les populations spontanées sont caractérisées par des tiges plus fines** avec une tendance des plantes à la plagiotropie, mais présentent néanmoins **une relative diversité des types architecturaux**. En effet, certaines populations spontanées se caractérisent par un port relativement érigé sans pour autant atteindre la taille des cultivars (TRIFI-FARAH *et al.*, 1989). En conséquence, l'exploitation chez cette espèce

des populations spontanées locales est d'un important intérêt agronomique du fait de leur qualité fourragère, tant pour la préservation des ressources que pour l'amélioration des parcours. En effet, **les formes sauvages bien adaptées constituent un potentiel génétique considérable permettant la sélection de formes améliorées pour la promotion des parcours** (DEAR *et al.*, 2003).

En Tunisie, les populations d'*H. coronarium* sont localisées dans plusieurs stations naturelles situées au nord de la dorsale qui, d'ouest en est, passe par Tajerouine, Makthar, Zaghouan et Enfidha, occupant ainsi tout le Tell (figure 1). Leur présence est liée à des **sols lourds** caractérisés par un drainage important et une structure fine (sols argilo-marneux). En outre, elles permettent la protection des sols contre l'érosion (FIGIER, 1982) et contribuent à leur enrichissement en azote assimilable grâce à leurs nodosités racinaires (GOUNOT, 1958).

### ■ Evaluation de la variabilité génétique de *H. coronarium*

La conservation des ressources phytogénétiques impose une évaluation préalable de la diversité génétique. En effet, plusieurs travaux ont déjà été réalisés chez l'espèce *H. coronarium*. Les résultats, basés sur la **variabilité morphologique** des caractères quantitatifs, ont montré l'existence d'une variabilité considérable des populations (CHATTI, 1987 ; BAATOUT *et al.*, 1991 ; LOUATI-NAMOUCHE *et al.*, 2000). En outre, les formes domestiquées de *H. coronarium*, comparées aux formes spontanées, s'avèrent caractérisées essentiellement par un port

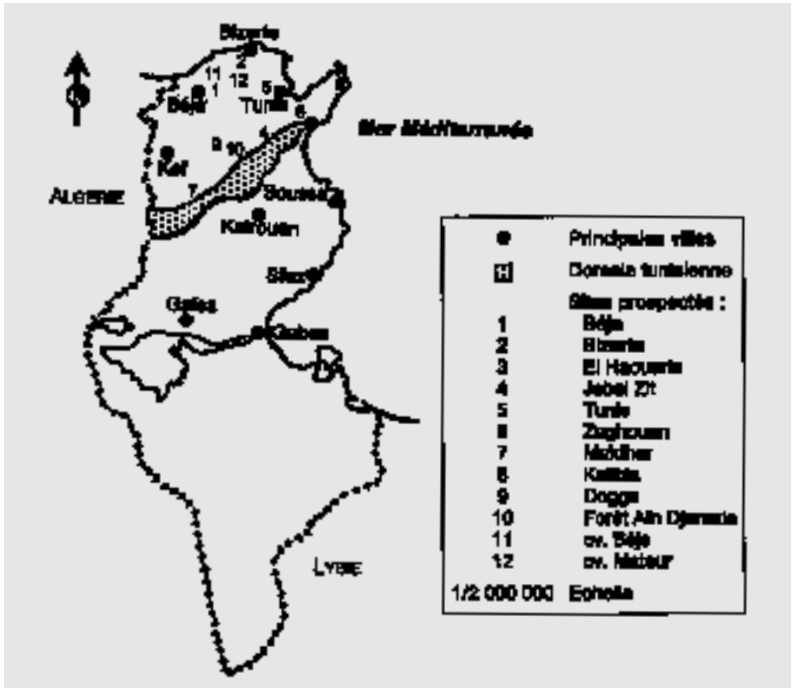


FIGURE 1 : Répartition en Tunisie des populations de *H. coronarium* étudiées.

FIGURE 1 : Distribution in Tunisia of the *H. coronarium* populations studied.

érigé (TRIFI-FARAH *et al.*, 1989). Des études portant sur la biologie de reproduction chez *H. coronarium* ont montré que cette espèce est préférentiellement allogame mais l'autofécondation reste possible avec un taux de 10% (LOUATI-NAMOUCHE *et al.*, 2000 ; YAGOURI et CHRIKI, 2000).

L'analyse du **polymorphisme enzymatique** a permis de révéler une importante diversité génétique sans distinguer significativement les deux formes domestiquée et spontanée. En effet, des flux de gènes, favorisés par l'allogamie et la sympatrie, peuvent intervenir entre les deux formes (TRIFI-FARAH *et al.*, 1989). Néanmoins, l'ensemble de ces marqueurs ne peut révéler qu'une partie de la variabilité génétique réelle. Les marqueurs moléculaires constituent un complément à la caractérisation morphologique (KARP *et al.*, 1997). Ainsi, les marqueurs moléculaires RFLP, impliquant des sondes ribosomales homologues (TRIFI-FARAH *et al.*, 2002), ont permis d'analyser la variabilité intra et interspécifique et la phylogénie de six espèces du genre *Hedysarum* (TRIFI-FARAH et MARRAKCHI, 2001). Dans ce contexte, notre choix a porté sur l'exploitation d'autres **outils moléculaires tels que les AFLP** car ils sont révélés en masse et couvrent l'ensemble du génome (VOS *et al.*, 1995 ; DONINI *et al.*, 1997 ; KEIPER et McCONCHIE, 2000 ; ROLDÁN-RUIZ *et al.*, 2000 ; SALIBA-COLOMBANI *et al.*, 2000).

En ce qui concerne *H. coronarium* L., les ressources génétiques que représentent les formes sauvages restent encore peu exploitées. Dans l'objectif de sauvegarder et valoriser la diversité génétique des populations spontanées autochtones, nous nous sommes intéressés à l'analyse de la variabilité génétique intra et interpopulations chez différentes populations spontanées et des cultivars de l'espèce *H. coronarium* en utilisant la technique AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

## 1. Matériel et méthodes

**Dix populations spontanées et deux cultivées** appartenant à l'espèce *H. coronarium* ont été utilisées dans ce travail. Ces accessions sont représentées par des échantillons de graines récoltées lors des différentes prospections effectuées sur le territoire tunisien. Cette étude a porté sur 15 plantes de chaque populations. Ainsi, nous avons utilisé les populations spontanées Jebel Zit [Zi] et Makthar [Ma] à tendance orthotropique et El Haouaria [Eh] à tendance plagiotropique. Les populations spontanées de Béja [Be], Bizerte [Bi], Dogga [Do], Forêt Aïn Djemala [Fo], Kelibia [Ke], Tunis [Tu] et Zaghouan [Za] présentent des types architecturaux intermédiaires. De même, nous avons utilisé deux cultivars à port érigé provenant de la région de Béja [cB] et de Mateur [cM]. La localisation des sites de collecte des différentes accessions étudiées est présentée figure 1. Les graines provenant des différents lieux sont décortiquées et scarifiées en vue d'éliminer l'inhibition tégumentaire. Après immersion dans l'eau pendant 24 h, elles sont mises à germer à température ambiante et à la lumière dans des boîtes de Petri sur du papier filtre imbibé d'eau.

## ■ Marquage AFLP

L'ADN est extrait à partir de chacune des 15 plantes appartenant aux différentes populations en utilisant le kit de mini-extraction (Quiagen). La concentration de l'ADN extrait de chaque échantillon est estimée à l'aide du spectrophotomètre Gene-Quant (Pharmacia) ainsi que sur gel d'agarose par comparaison avec une gamme étalon de différentes concentrations connues de l'ADN du phage  $\lambda$  (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Les marqueurs AFLP sont générés en utilisant le kit AFLP Analysis System I (Life Technologies, Inc.) avec de petites modifications (MARGHALI *et al.*, 2002). Nous avons utilisé trois couples d'amorces décrits dans le tableau 1. Les produits d'amplification obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant à 6% contenant du TBE 1x. Dix microlitres de produits PCR sont mélangés à 3  $\mu$ l de bleu de séquence STR 6x (98% formamide, 10mM EDTA pH 8, 1% xylène cyanol et 1% bromophénol) et 3  $\mu$ l du mélange sont déposés dans le gel. Pour la migration des échantillons, nous avons utilisé une tension de 1 500 V et une puissance de 70 W. Les bandes AFLP sont ainsi visualisées par coloration au nitrate d'argent (BASSAM *et al.*, 1991 ; CHALHOUB *et al.*, 1997). Le gel sèche toute une nuit à température ambiante, puis est photographié à l'aide d'un film APC Typon.

## ■ Analyses statistiques

Les résultats issus de cette étude moléculaire par AFLP ont été soumis à différentes méthodes d'analyses statistiques. Chaque bande polymorphe ou marqueur moléculaire est considéré comme un caractère ayant deux états, présence ou absence, codés respectivement par des valeurs 1 ou 0. Les résultats obtenus sont ainsi transformés en une matrice binaire des données qui sera exploitée pour le calcul de

$$\text{l'indice de Shannon } H = - \sum_{i=1}^k p_i \log_n p_i$$

(avec k : nombre de bandes ;  $p_i$  : fréquence de la bande i dans une population ; H : diversité génétique) (LEWONTIN, 1972 ; LYNN et SCHAAL, 1989 ; BUSSEL, 1999). L'indice a été calculé d'abord pour chaque population et chaque couple

d'amorces, puis un indice moyen à chaque population a été calculé ( $H_0$  = diversité intrapopulation). La moyenne des indices sur les 12 populations reflète la diversité intrapopulation moyenne ( $H_{pop}$ ). L'indice sur

TABLEAU 1 : Marqueurs AFLP générés au sein des 12 populations chez *H. coronarium* L. en utilisant 3 combinaisons d'amorces.

TABLE 1 : AFLP markers generated within the 12 populations of *H. coronarium* L. by the use of 3 combinations of primers.

Amorces	Nombre total de bandes AFLP	Bandes AFLP polymorphes	
		nombre	(%)
E <sub>ADT</sub> /M <sub>0AA</sub>	65	51	78,5
E <sub>ADG</sub> /M <sub>0TT</sub>	70	60	85,7
E <sub>ADG</sub> /M <sub>0AA</sub>	72	67	93,0
<b>Totaux</b>	<b>207</b>	<b>178</b>	<b>86,0</b>

l'ensemble des populations ( $H_{sp}$ ) est estimé en considérant que les 180 individus correspondent à la diversité totale. Les pourcentages de variation intra et interpopulations sont respectivement les rapports de la diversité intrapopulation moyenne sur la diversité totale ( $(H_{pop}/H_{sp}) \times 100$ ) et de la diversité interpopulations exprimée selon la formule  $G_{st} = (H_{sp} - H_{pop})/H_{sp} \times 100$ .

Les **distances génétiques interpopulations** sont estimées selon la formule de Nei et Li (1979) grâce au programme GENEDIST (version 3.572c ; FELSENSTEIN, 1995). Sur la base de la méthode de l'UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging*), la matrice des distances génétiques est utilisée par le programme Neighbour pour générer des arbres phylogénétiques sous forme de fichiers. Grâce au programme TREEVIEW, ces fichiers sont transformés sous forme de dendrogrammes représentant les distances génétiques correspondantes.

## 2. Résultats et discussion

Une première approche de l'analyse de la variabilité génétique a consisté à estimer le nombre de bandes polymorphes d'après les bandes révélées sur gel de polyacrylamide dénaturant. Nous avons ainsi recensé chez les individus des 12 populations étudiées deux cent sept bandes dont la taille est comprise entre 40 et 600 pb. Parmi celles-ci, 178 bandes se sont révélées polymorphes. Avec un **taux de bandes polymorphes égal à 86%** sur l'ensemble des accessions, on remarque **une importante variabilité génétique**. Le nombre total de bandes polymorphes par paire d'amorces varie de 51 pour la combinaison  $E_{ACT}/M_{CAG}$  à 67 pour le **couple  $E_{AGC}/M_{CAA}$** , avec une moyenne de 59 bandes polymorphes révélées par combinaison (tableau 1).

### ■ Analyse de la diversité intrapopulation

L'ensemble des résultats révèle un nombre de bandes polymorphes important variant entre 12 concernant la population de Béja et 31 pour celle de Tunis. En outre, deux bandes obtenues dans le cas de l'amorce  $E_{AGC}/M_{CAA}$  sont présentes uniquement chez les culti-

TABLEAU 2 : Indices de diversité génétique de Shannon pour chaque population et diversité totale, calculés à partir de l'ensemble des marqueurs AFLP.

TABLE 2 : *Shannon indices of genetic diversity in each population and total diversity, as computed from the totality of AFLP markers.*

	chl	cb	Za	Ma	Ka	Be	Tu	Eh	Zi	Do	Fo	Bi	$H_{pop}$	$H_{sp}$	$H_{pop}/H_{sp}$	$G_{st}$
H : $E_{ACT}/M_{CAG}$	10,9	10,8	10,2	11,1	10,1	6,5	16,7	13,5	11,5	16,1	16,4	8,4	11,8	17,0	69,7	30,3
H : $E_{AGC}/M_{CAA}$	12,8	12,3	11,7	12,7	11,6	6,5	19,0	14,7	11,5	19,1	19,2	8,4	13,3	19,7	67,4	32,6
H : $E_{AGC}/M_{CAA}$	13,7	13,6	12,5	14,6	13,2	7,7	22,2	15,5	12,6	21,3	21,8	10,3	14,9	21,9	67,9	32,0
$H_i$	12,5	12,2	11,5	12,8	11,6	6,9	19,3	14,6	11,9	18,9	19,1	9,0	13,4	19,6	68,3	31,7

Légende : chl : cultivar Mateur, cb : cultivar Béja, Za : Zaghwan, Ma : Makhar, Ka : Kalbia, Be : Béja, Tu : Tunis, Eh : El Haouaria, Zi : Jébel Zit, Do : Dogga, Fo : Forêt Ain Djemala, Bi : Bizem.

H : diversité intrapopulation pour chaque combinaison d'amorces ;  $H_i$  : diversité intrapopulation ;  $H_{sp}$  : diversité intrapopulation moyenne ;  $H_{pop}$  : diversité totale ;  $H_{pop}/H_{sp} \times 100$  : pourcentage de la diversité intrapopulation par rapport à la diversité totale ;  $G_{st} = (H_{sp} - H_{pop})/H_{sp} \times 100$  : pourcentage de la diversité interpopulation par rapport à la diversité totale.

vars et seraient considérées comme des marqueurs moléculaires caractéristiques des formes cultivées.

En tenant compte de l'ensemble des bandes polymorphes générées avec les trois couples d'amorces, l'analyse de la structure génétique des populations a été conduite en utilisant l'indice de Shannon. Sur la base des 178 bandes générées à partir des 12 populations, nous avons déterminé la fréquence moyenne de chaque bande pour exprimer les indices de diversité génétique de Shannon (H) (tableau 2). La **diversité génétique totale  $H_{sp}$  est de 19,6** ; les trois couples d'amorces donnent des résultats similaires. La diversité au sein des populations varie de 6,9 pour la population de Béja à 19,3 pour la population de Tunis avec une moyenne sur l'ensemble des populations de 13,4. Ces résultats suggèrent que la population de Béja [Be] présente une diversité génétique relativement restreinte entre les individus, alors que la population de Tunis semble être très variable. La diversité moyenne intrapopulation représente 68,3% de la diversité génétique totale. Cela montre qu'**une large proportion de la variabilité chez *H. coronarium* se situe au niveau intrapopulation**. Des résultats comparables ont été obtenus chez *H. coronarium* en utilisant des marqueurs iso-enzymatiques (LOUATI-NAMOUCHE, 2001). Le régime de reproduction préférentiellement allogame de cette espèce contribue à maintenir une diversité intrapopulation.

L'ensemble des résultats obtenus témoigne de l'importante diversité génétique des populations étudiées. La population spontanée de Béja est caractérisée par une faible diversité génétique malgré la sympatrie des deux formes spontanées et cultivées, ainsi que le mode de reproduction préférentiellement allogame de *H. coronarium*. La population de Tunis semble être cosmopolite, d'où une variabilité plus importante au sein de cette population.

## ■ Analyse de la diversité interpopulations

La proportion de la diversité génétique attribuable à la différenciation des populations  $G_{ST}$  **varie de 30,34 à 32,07% selon le couple d'amorce utilisé**, avec une moyenne de 31,68% pour l'ensemble des loci (tableau 2). Par conséquent, nous pouvons en déduire que **la variabilité exprimée au niveau interpopulation représente une partie restreinte** de la diversité révélée par cette étude.

Par ailleurs, la variabilité génétique entre les douze populations étudiées a été estimée à l'aide des distances de NEI et  $L_i$  (1979). L'analyse de la matrice des distances génétiques basée sur les marqueurs AFLP (tableau 3) montre que les distances génétiques entre les populations varient entre 0,096 et 0,961. Il en découle qu'**il existe une grande diversité génétique au niveau moléculaire entre les 12 populations étudiées**. La distance génétique la plus faible se situe entre les deux cultivars. La valeur la plus élevée se situe entre les populations spontanées de El Haouaria [Eh] et Jebel Zit [Zi]. Il en résulte que ces deux populations sont les plus divergentes au niveau de leur ADN. Ceci a été démontré également en utilisant les marqueurs morphologiques (FIGIER, 1982 ; TRIFI-FARAH *et al.*, 1989). En effet, ces

	cM	Za	cB	Ma	Ke	Be	Tu	Eh	Zi	Do	Fo	Bi
cM	0,000											
Za	0,734	0,000										
cB	<b>0,000</b>	0,629	0,000									
Ma	0,481	0,805	0,378	0,000								
Ke	0,487	0,242	0,488	0,749	0,000							
Be	0,142	0,124	0,186	0,298	0,140	0,000						
Tu	0,248	0,216	0,260	0,285	0,208	0,161	0,000					
Eh	0,748	0,723	0,836	0,795	0,590	0,484	0,134	0,000				
Zi	0,698	0,814	0,561	0,589	0,873	0,307	0,549	<b>0,961</b>	0,000			
Do	0,387	0,287	0,420	0,311	0,573	0,376	0,108	0,374	0,414	0,000		
Fo	0,667	0,277	0,572	0,494	0,274	0,409	0,111	0,628	0,613	0,118	0,000	
Bi	0,735	0,575	0,816	0,495	0,409	0,196	0,211	0,296	0,311	0,519	0,301	0,000

deux populations spontanées présentent des architectures contrastées : celle de El Haouaria est caractérisée par un port rampant alors que le port est érigé pour la population Zit.

La matrice des distances génétiques a permis de schématiser les relations phylogénétiques entre ces populations sous forme de dendrogramme (figure 2). Ainsi, on remarque **la ressemblance des deux cultivars [cB, cM] et leur éloignement des populations spontanées à axe orthotrope [Zi, Ma]**. Le cultivar Béja [cB] présente une relative proximité avec la population spontanée de la même localité [Be]. Ce résultat est attendu étant donné l'allogamie préférentielle de cette espèce suscitant des échanges géniques entre les deux formes spontanées et cultivées.

## Conclusions

L'importante diversité de toutes les populations spontanées et cultivées de *H. coronarium* est révélatrice d'un potentiel génétique important susceptible de permettre une meilleure exploitation agronomique, en particulier la valorisation des jachères, la protection des sols marneux en pente et la production de fourrage. De plus, la variabilité intra et interpopulations est importante, ce qui s'expliquerait par des échanges géniques étant donné le régime préférentiellement allogame de cette espèce.



TABLEAU 3 : **Matrice des distances génétiques entre populations de *H. coronarium*** basée sur les marqueurs AFLP selon la formule de Nei et Li (1979) (nom des cultivars : voir tableau 2).

TABLE 3 : **Matrix of genetic distances among *H. coronarium* populations**, based on the AFLP markers according to Nei and Li's (1979) formula (for the name of cultivars, see table 2).

FIGURE 2 : **Dendrogramme des 12 populations de *H. coronarium* étudiées** selon la méthode UPGMA (nom des cultivars : voir tableau 2).

FIGURE 2 : **Dendrogramme of the 12 populations of *H. coronarium* studied**, according to the UPGMA method (for the name of cultivars, see table 2).



Concernant les formes cultivées et spontanées, elles se rapprochent significativement au niveau de ces marqueurs AFLP bien qu'elles soient distinctes morphologiquement. Néanmoins, deux marqueurs AFLP générés par la combinaison  $E_{AGC}/M_{CAA}$ , et révélés chez toutes les plantes cultivées analysées semblent être spécifiques des cultivars et seraient utiles lors de programmes d'amélioration assistés par ces marqueurs moléculaires.

Accepté pour publication, le 30 juillet 2003

### Remerciements

Nos remerciements s'adressent au Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie et à l'Institut Français de Coopération.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDELGUERFI-BERREKIA R., ABDELGUERFI A. (1986) : "Valorisation des ressources phylogénétiques locales d'intérêt fourrager dans l'aménagement des zones de montagne", *Annuel de l'Institut Agronomique, El-Harrach*, 10, n°2, 1-11.
- BAATOUT H., MARRAKCHI M., PERNES J. (1990) : "Electrophoretic studies of genetic variation in natural populations of allogamous *Hedysarum capitatum* and autogamous *Hedysarum euspinosissimum*", *Plant Science*, 69, 49-64.
- BAATOUT H., MARRAKCHI M., COMBES C. (1991) : "Genetic divergence and allozyme variation within and among populations of *Hedysarum spinosissimum* ssp. *capitatum* and ssp. *euspinosissimum* (Papilionaceae)", *Taxon.*, 40, 239-252.
- BARRY T.N. (1998) : "The feeding value of forage chicory (*Cichorium intybus*) for ruminant livestock", *J. Agric. Sci., Cambridge*, 131, 251-257.
- BASSAM B.J., CAETANO-ANOLLÈS G., GRESSHOFF P.M. (1991) : "Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels", *Annals of Biochemistry*, 196, 80-83.
- BOUSSAÏD M., BEN FADHEL N., TRIFI-FARAH N., ABDELKEFI A., MARRAKCHI M. (1995) : "Les espèces Méditerranéennes du genre *Hedysarum* L.", *Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon*, BRG/INRA éd. France, 115-130.
- BULLITA S., BULLITA P., SABA P. (2000) : "Seed production and its components in sardinian germplasm of *H. coronarium* L. and *H. spinosissimum* L.", *Cahiers Options Méditerranéennes*, 45, 355-358.

- BUSSEL J.D. (1999) : "The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity among populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae)", *Molecular Ecology*, 8, 775-789.
- CENNI B., JANNELA G.G., COLOMBANI N. (1968) : "Chemical composition, digestibility and nutritive value of sulla (*Hedysarum coronarium* L.) hay produced in Volterra district", *Annals of the Faculty of Medicine Veterinary*, University of Pisa, 20, 155-168.
- CHALHOUB B.A., THIBAUT S., LAUCOU V., RAMEAU C., HOLFE H., COUSIN R. (1997) : "Silver Staining and recovery of AFLPTM amplification products on large denaturing polyacrylamide gels", *Biotechniques*, 22, n°2, 216-220.
- CHATTI W.S. (1987) : *Analyse de la diversité génétique basée sur les caractères morphologiques et le polymorphisme enzymatique des espèces H. coronarium L. et H. carnosum Desf. Relations phylogénétiques avec le complexe H. spinosissimum L.*, thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Faculté des Sciences de Tunis, 126 p.
- DEAR B.S., MOORE G.A., HUGHES G.J. (2003) : "Adaptation and potential contribution of temperate legumes to the southern Australian wheatbelt : a review", *Australian J. of Experimental Agric.*, 43, n°1, 1-18.
- DONINI P., ELIAS M.L., BOUGOURD S.M., KOEBNER R.M.D. (1997) : "AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs", *Genome*, 40, 521-526.
- FELSENSTEIN J. (1995) : *PHYLIP (Phylogenetic Interference Package) Version 3.5 c*, Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA.
- FIGIER J. (1982) : *Etude de la variabilité et du déterminisme de la morphologie de l'Hedysarum coronarium L. en Tunisie. Implications concernant l'amélioration de cette espèce fourragère dans ce pays*, thèse Doctorat d'Etat, Université Paris-Sud, Orsay, 236 p.
- GOUNOT M. (1958) : "Contribution à l'étude des groupements végétaux messicoles et rudéraux de la Tunisie", *Ann. Serv. Bot. Agron.*, Tunisie, 31, 282 p.
- KARP A., KRESOVICH S., BHAT K.V., AYAD W.G., HODGKIN T. (1997) : "Molecular tools in plant genetic resources conservation : a guide to the technologies", *IPGRI Technical Bulletin*, n°2, International Plant Genet. Res. Inst., Italy.
- KEIPER F.J., MCCONCHIE R. (2000) : "An analysis of genetic variation in natural populations of *Sticherus flabellatus* [R. Br. (St John)] using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers", *Molecular Ecology*, 9, 571-581.
- KRISHNA H., KEMP D.P., NEWTON S.D. (1990) : "Necton sulla. A preliminary agronomic evaluation", *Proc. New Zealand Grassl. Assoc.*, 52, 157-159.
- LE HOUEROU H.N. (1969) : *Principes, méthodes et techniques d'amélioration pastorale et fourragère. Pâturage et cultures fourragères*, Etude n°2, FAO, Rome.
- LEWONTIN R.C. (1972) : "The apportionment of human diversity", *Evolution Biology*, 6, 381-398.
- LOUATI-NAMOUCHE I., LOUATI M., CHRIKI A. (2000) : "Mating system and multiple paternity in *Hedysarum coronarium* L. (Fabaceae)", *Agronomie*, 20, 655-663.

- LOUATI-NAMOUCHE I. (2001) : *Etude de la variabilité morphologique et du régime de reproduction par les paramètres de fertilité et les marqueurs iso-enzymatiques chez H. coronarium L.*, thèse de Doctorat de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis, 204 p.
- LYNN M.K., SCHAAL B.A. (1989) : "Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*", *Evolution*, 43, n°5, 1117-1119.
- MARGHALI S., TRIFI-FARAH N., GHARIANI S., MARRAKCHI M. (2002) : "Exploration of the genetic diversity in *Hedysarum* genus detected by AFLPs", *Proc. 19<sup>th</sup> Gen. Meet. Eur. Grassl. Fed.*, France, Durand J.L., J.C. Emile, C. Huyghe & G. Lemaire édés., 7, 444-445.
- NEI M., LI W.S. (1979) : "Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease", *Proc. National Acad. of Sci. (USA)*, 76, 5269-5273.
- POTTIER-ALAPETITE G. (1979) : *Flore de la Tunisie. Angiospermes Dicotylédones. Apétales-Dialypétales*, Imp. Off. Rep., Tunisienne, 542 p.
- RESTUCCIA G. (1976) : "I contributi della ricerca al miglioramento della tecnica colturale della sulla (*Hedysarum coronarium* L.) in Italia", *Tecnica Agricola*, 28, 1-15.
- ROLDÁN-RUIZ I., DENDAUV J., VAN BOCKSTAELE E., DEPICKER A., DE LOOSE M. (2000) : "AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.)", *Molecular Breeding*, 6, 125-134.
- SALIBA-COLOMBANI V., CAUSSE M., GERVAIS L., PHILOUZE J. (2000) : "Efficiency of RFLP, RAPD and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome", *Genome*, 43, n°1, 29-40.
- SAMBROOK J., FRITISCH E.F., MANIATIS T. (1989) : *Molecular cloning : a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- TRIFI-FARAH N., CHATTI W.S., MARRAKCHI M., PERNES J. (1989) : "Analyse de la variabilité morphologique et enzymatique des formes cultivées et spontanées de *Hedysarum coronarium* L. en Tunisie", *Agronomie*, 9, 591-598.
- TRIFI-FARAH N. ET MARRAKCHI M. (2001) : "*Hedysarum* phylogeny mediated by RFLP analysis of nuclear ribosomal DNA", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48, n°4, 339-345.
- TRIFI-FARAH N., BAATOUT H., BOUSSAÏD M., COMBES D., FIGIER J., HANNACHI-SALHI A., MARRAKCHI M. (2002) : "Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen", *Plant Genetic Resources Newsletter*, 130, 1-6.
- VOS, P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJNS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M. (1995) : "AFLP : a new technique for DNA fingerprinting", *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
- YAGOUBI, CHRIKI (2000) : "Heritabilities and genetic correlation between floral and reproductive traits in *Hedysarum coronarium* L. (Fabaceae)", *Agronomie Africaine*, 12, n°3, 91-134.
- ZANINI E., BALLATORE G.P. (1950) : "Resultadi di colture d'orientamento con sulla di diversa provenienza, esse ginte nelle annate 1948-1949 y 1949-1950 in territorio di caltanissetta", *Annals of the Faculty of Agriculture*, University of Palermo, Italie.

SUMMARY

**Genetic diversity among populations of *Hedysarum coronarium* L., as revealed by AFLP markers**

The conservation of bio-diversity among cultivated plants and their wild relatives is of particular importance in Tunisia, where a severe genetic erosion has been observed. Among the forage legumes (family Leguminosae = Fabaceae), the genus *Hedysarum* is of great importance, since it can provide new phylogenetic resources able to increase the value of pastoral lands and the benefits derived from them. The diploid and tetraploid Mediterranean species ( $x=8$ ) of this genus differ by their morphological habits, pollination system, biological cycle and geographical origin. Among them, all nutritious and highly palatable to sheep, only *H. coronarium* L. (commonly called Sulla or Spanish Sainfoin), a native of Italy, is grown for fodder : e.g. in Spain, Greece and North Africa.

In this study, the genetic diversity of *H. coronarium* was ascertained by an AFLP analysis of 180 individual plants belonging to ten spontaneous local populations and to two cultivars. A total of 207 bands were amplified, among which 178 (86%) revealed polymorphism. These were scored as AFLP bands and computed with the Shannon index. In addition, polymorphic bands were also analysed to produce a genetic distance matrix following Nei and Li's (1979) formula. A cluster analysis using the UGPMA method (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average) was also performed, using Neighbor's programme. Our data show that the AFLP method is an efficient tool to examine the genetic diversity among and within accessions of *H. coronarium*. The great discriminative power of AFLP markers and their ability to represent genetic relationships among *Hedysarum* plants was confirmed. Our data exhibit evidence of great similarity between the two cultivars originating from Béja and Mateur, and also a relative distance from the spontaneous populations of Jebel Zit and Makthar, which are characterized by an orthotropic form. In addition, the Béja cultivar is relatively close to the spontaneous population of same origin.