

Caractérisation morphologique et moléculaire des espèces ligneuses du genre *Medicago*

H. Chebbi¹, M.J. Pascual-Villalobos², J.L. Cenis², E. Correal²

Pour la taxinomie et la distinction entre taxons, certaines différences morphologiques peuvent parfois suffire. Quelquefois, un seul caractère observable permet de différencier une espèce ou un groupe d'espèces (couleur de la corolle, type de gousse, etc.). Mais le cas le plus commun est le chevauchement des taxons ; dans ce cas, un ensemble de caractères doit être considéré pour caractériser les espèces (LESINS et LESINS, 1979).

Les principaux travaux de classification des espèces du genre *Medicago* reposent sur des composants morphologiques tels que la feuille et ses caractéristiques, le fruit et la semence, les cotylédons, la fleur, les grains de pollen, les nodules, et d'autres critères comme le nombre chromosomique, les défenses chimiques, etc. (POLHILL et al., 1981).

MOTS CLÉS

Luzerne, marquage génétique, *Medicago arborea*, *M. citrina*, *M. strasseri*, pays méditerranéen, plante ligneuse, variabilité génétique, variabilité intraspécifique.

KEY-WORDS

Genetical markers, genetical variability, intraspecific variability, luzerne, *Medicago arborea*, *M. citrina*, *M. strasseri*, mediterranean area, woody plant.

AUTEURS

1 : Ingénieur Agronome, boursier de l'IAM Saragosse pour le cours d'amélioration génétique végétale. Oued Jedra, 9060 Testour-Béja, Tunisie.

2 : Consejería de Agricultura, Centro de Investigacion y Desarrollo Agroalimentario, 30150 La Alberca (Murcia), Espagne.

Le genre *Medicago*, contient approximativement 55 espèces dont certaines jouent un rôle majeur en production fourragère (LESINS et LESINS, 1979). Les auteurs recensent seulement une espèce arbustive (*M. arborea* L.) ; **trois espèces pérennes ligneuses ont été récemment décrites** : *M. arborea*, *M. strasseri* Greuter et *M. citrina* (Font-Quer) Greuter (= *M. arborea* var. *citrina* Font-Quer ; ROBLED0 et al., 1993 ; GREUTER et al., 1982 ; GREUTER, 1986). Ces espèces ont des niveaux de ploïdie différents, et seule *M. arborea* est connue en tant qu'espèce à allogamie prédominante (AYAT et MANSAT, 1987).

L'évaluation de ces espèces et la mise en évidence de leur base génétique pourraient bénéficier de la technique de marquage moléculaire car la variation au niveau de l'ADN offre de nombreux avantages par rapport aux données morphologiques pour examiner les relations entre espèces : la variation détectée par l'analyse moléculaire de l'ADN peut être quantifiée et n'est pas sujette aux effets environnementaux (KAZAN et al., 1993).

Il existe plusieurs systèmes de marquage génétique basés sur l'analyse de l'ADN, utilisés dans quelques cas en amélioration des plantes. La plupart des techniques de marquage moléculaire ont commencé par l'utilisation des RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et certaines cartes génétiques ont été développées pour plusieurs espèces d'intérêt agronomique. De plus, les RFLP ont été utilisés pour obtenir des marqueurs liés à des caractères agronomiques et pour étudier l'évolution et les relations phylogénétiques des plantes (PATERSON et al., 1991).

Plus récemment, une nouvelle technique plus rapide, basée sur le processus de PCR (Polymerase Chain Reaction), nommée RAPD, a été introduite (WILLIAMS et al., 1990 ; WELSH et al., 1991). Elle est basée sur l'amplification enzymatique des fragments courts de l'ADN, distribués au hasard dans le génome. Cette procédure a l'avantage d'être techniquement simple, nécessite de petites quantités d'ADN et exclut l'usage de la radioactivité. Les RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) conviennent aussi pour manipuler les larges échantillons nécessaires en amélioration des plantes, génétique des populations, et étude de la biodiversité (WAUGH et POWELL, 1993). L'inconvénient majeur des RAPD est la relativement faible reproductibilité de quelques produits d'amplification (RAFALSKI et TINGEY, 1993 ; WAUGH et POWELL, 1993).

Dans la présente étude, **la mise en évidence des similarités et des différences entre individus d'une même espèce ou d'espèces différentes a été basée sur la caractérisation générale des plantes**, la caractérisation de la feuille (et de ses appendices) et celle de la fleur. **La technique RAPD a été utilisée d'une part pour analyser les relations entre quatre populations** (trois espèces ligneuses du genre *Medicago*) et d'autre part **pour étudier la variabilité génétique** entre plantes de la

même espèce (variation intraspécifique). Le deuxième objectif de cette étude est de comparer les résultats de l'évaluation morphologique et ceux de la caractérisation moléculaire, et d'analyser le degré de concordance entre les deux méthodes.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

L'aire principale de *M. arborea* ($2n=4x=32$) est la zone continentale de la Grèce et les îles de la mer Égée, mais elle est présente aussi en Crète, Albanie, Turquie et Italie. On la trouve principalement en Sicile, France, Espagne, Portugal, Algérie et Tunisie (COSTE, 1906 ; VILLAX, 1963 ; PIGNATTI, 1982 ; BÔLOS et VIGO, 1984 ; GREUTER et al., 1989). Deux provenances de semences de l'espèce ont été évaluées : une d'Athènes (Grèce) et l'autre de Tunisie, obtenue à travers une coopération de la FAO.

M. citrina ($2n=6x=48$) est endémique des îles Columbretes et d'autres petites îles proches d'Ibiza et Cabrera (îles Baléares), localisées sur la côte est de l'Espagne. Elle a été décrite, au début, comme une variété de *M. arborea* (FONT-QUER, 1924); plus tard comme sous-espèce (BÔLOS et VIGO, 1974), et finalement comme une nouvelle espèce (GREUTER, 1986). Notre lot de semences d'origine a été envoyé par Muncharaz (Département d'Agriculture de Valence, Espagne) dont la collection provient du parc naturel des îles Columbretes.

M. strasseri ($2n=?$), endémique de la Crète (Grèce), a été décrite récemment par GREUTER et al. (1982). Le lot de semences est obtenu de Ceresuela (E.T.S.I.A. Madrid, Espagne) après multiplication d'un échantillon provenant du jardin botanique de Berlin.

2. Etude moléculaire

Dans une première étape, on a procédé par échantillonnage au hasard de 4-5 feuilles d'âge similaire par plante ; dans l'ensemble on obtient dix échantillons par espèce. L'extraction de l'ADN a été faite selon une minipréparation décrite par CENIS (1992) pour l'extraction de l'ADN des champignons. Le protocole d'amplification d'ADN suivi est celui décrit par WILLIAMS et al. (1990). Les réactions RAPD ont été menées dans un thermocycleur Perkin Elmer 9600. Les amorces utilisées sont OPA, OPB et OPC, et chaque réaction a été répétée deux fois.

Seules les bandes continuellement reproduites ont été retenues dans l'analyse des données ; toute bande ambiguë est déclassée et n'est plus introduite dans le cal-

cul. La fraction de bandes en commun (F ou similarité génotypique) entre deux génotypes a été estimée en utilisant la formule de Nei et Li (1979) comme suit :

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y),$$

où N_{xy} est le nombre de bandes présentes à la fois chez les deux génotypes, et N_x et N_y sont les nombres de bandes dans chacun des génotypes x et y. La méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) du programme NTSYS Ver.1.4 (ROHLF, 1988) a été utilisée pour l'analyse des similarités et la procédure d'arbre a été appliquée pour produire un phénogramme.

3. Evaluation morphologique

En premier lieu, on effectue des mesures sur le port et la structure générale d'une plante : détermination du diamètre des plantes dans le sens de la ligne (D1) et le sens transversal (D2), du nombre de tiges principales, de la hauteur du feuillage (le point de densité foliaire maximale) et de la hauteur maximale (le point le plus haut de la plante).

Pour chaque espèce, dix feuilles ont été échantillonnées au hasard pour chacune des dix plantes (on obtient dix échantillons correspondant aux individus de l'espèce). A l'aide d'une règle de précision on détermine la longueur des organes suivants : pétiole, stipules, foliole centrale et feuille totale, et la largeur de la feuille et de la foliole centrale.

Pour déterminer le nombre de poils par unité de surface foliaire, un outil spécial (cylindre de fer de 2,7 mm de diamètre) est utilisé pour couper des disques foliaires à dimension uniforme à partir de la foliole centrale (éviter la zone de la nervure principale). A l'aide d'un appareil binoculaire, on note tout d'abord la présence et la densité de la couche cireuse sur la face supérieure, puis on compte le nombre de poils présents sur la face inférieure (généralement la face supérieure ne comporte pas de poils).

On procède de la même manière pour l'étude de la fleur ; les principales mesures réalisées sont la longueur de la fleur, la hauteur de l'étendard ouvert, le nombre de fleurs par pédoncule, la longueur du pédoncule floral et la longueur du pédicelle.

Pour l'étude morphométrique de la feuille et de la fleur, le dispositif hiérarchique suivant a été appliqué :

- espèce avec trois niveaux, *M. arborea*-FAO, *M. citrina* et *M. strasseri*,
- plante avec dix plantes dans chaque espèce,
- répétition, en échantillonnant dix feuilles ou dix fleurs par plante.

Un total de cent mesures a été fait pour chaque espèce et pour chacun des caractères étudiés. Anova a été utilisée pour ce dispositif afin d'étudier les variations intra et interspécifiques.

Dans cette étude où dix-sept caractères sont examinés (tableau 2), treize d'entre eux (tableau 4) ont été choisis pour continuer l'analyse multivariable (analyse des groupes et analyse des principaux composants utilisant le modèle statistique Genstat.S). La similarité entre deux génotypes *i* et *j* est estimée par la formule (r_k étant le rang d'un caractère) :

$$S_{ij,k} = 1 - [(X_{ik} - X_{jk}) / r_k]^2$$

Le calcul de S_{ij} a permis d'élaborer une matrice de similarité et la procédure de l'arbre a été appliquée pour produire un dendrogramme. Enfin, l'analyse des principaux composants de variation a été réalisée pour détecter la source de variation et le degré de participation de chaque caractère à cette variation.

Résultats

1. Caractérisation moléculaire

● Variations entre espèces

Pour chacune des amorces utilisées, un profil multi-bandes a été obtenu contenant de 3 à 6 bandes majeures et un nombre variable de bandes mineures. La complexité des profils confirme des observations antérieures : **le nombre de bandes RAPD est indépendant de la complexité du génome**. Un exemple typique est illustré par la figure 1a qui révèle une différence significative entre les trois espèces. Avec l'amorce OPC-9, trois fragments amplifiés sont présents chez toutes les accessions à l'exception de *M. citrina* qui partage une seule bande avec le reste. L'amorce OPB-16 a permis de distinguer les deux provenances de *M. arborea* par la présence d'une bande en plus chez *M. arborea*-Grèce. D'autre part, l'amorce OPB-5 amplifie les mêmes produits pour *M. strasseri* et *M. arborea*-Grèce. Le coefficient de similarité (F) varie de 84,7% pour les génotypes intimement proches à 59,3% pour les plus distants (tableau 1).

● Variation intraspécifique

Parmi huit amorces testées (OPB-7, -13, -14, -19 et -20 et OPC-3, -5 et -9), l'amorce OPB-7 a permis une meilleure amplification de l'ADN des dix plantes de *M. arborea*-FAO (figure 1b). Pratiquement, c'est l'espèce qui montre la plus grande

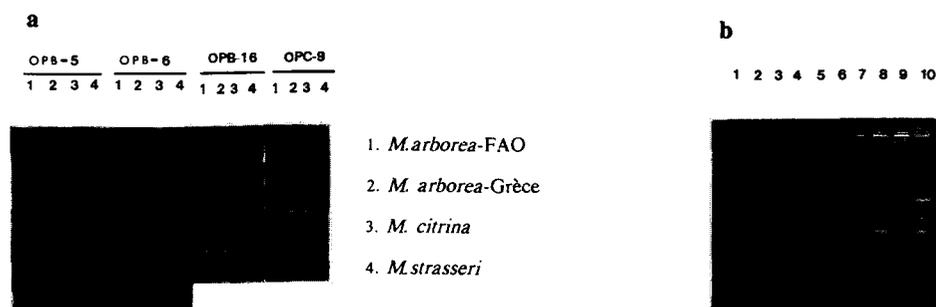


FIGURE 1 : Produits d'amplification obtenus avec des réactions RAPD : a) réaction avec les amorces OPB-5, OPB-6, OPB-16 et OPC-9 de diverses espèces de *Medicago*, b) réaction d'amorce OPB-7 avec 10 plantes de *M. arborea*-FAO.

FIGURE 1 : Amplification products obtained after RAPD reactions : a) reaction with the primers OPB-5, OPB-6, OPB-16 and OPC-9 of several *Medicago* species, b) reaction of OPB-7 with 10 plants of *M. arborea*-FAO.

variabilité intraspécifique, ayant une fréquence moyenne de polymorphisme égale à 21,7%. La similarité entre génotypes, estimée par le calcul de F, varie de 46,2% (calculée pour le couple 5 et 7) à 95,7% (calculée pour les couples 2 et 4, et 4 et 8), en ayant une moyenne de 78,2%.

La plante n°5, voire aussi la plante n°1, est clairement la plus divergente des autres comme indiqué sur le phénogramme (figure 2). La variabilité dans *M. arborea*-FAO est relativement importante et chaque plante semble être un génotype différent surtout à niveau de similarité supérieur à 90%.

Parmi les amorces testées, seuls deux oligonucléotides ont été choisis pour dégager les similarités et les différences entre les dix génotypes de *M. citrina*. Une légère variation dans le nombre de produits d'amplification a été constatée : la majorité des individus possède au total huit bandes. La fréquence moyenne de polymorphisme n'a pas dépassé 9,4%. Dans cette espèce, seul le génotype 2 diverge des autres (figure 2) ; les autres génotypes sont classés dans deux sous-groupes à coeffi-

	<i>M. arborea</i> FAO	<i>M. arborea</i> Grèce	<i>M. citrina</i>
<i>M. arborea</i> -Grèce	0,746		
<i>M. citrina</i>	0,593	0,764	
<i>M. strasseri</i>	0,759	0,847	0,667

TABLEAU 1 : Représentation du coefficient de similarité déterminé à partir de l'analyse utilisant 10 amorces différentes.

TABLE 1 : Coefficients of similarity from the analysis of ten different primers.

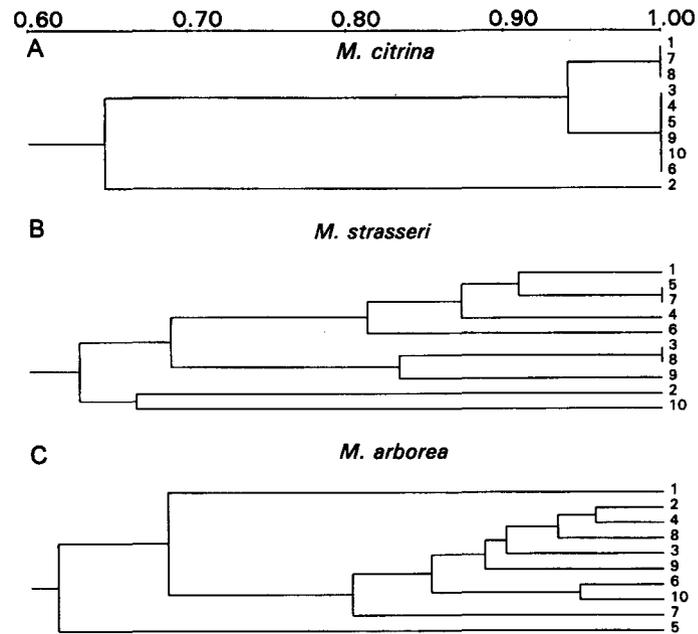


FIGURE 2 : Phénogramme basé sur les données de similarité des réactions RAPD des 10 plantes de *Medicago citrina*, *M. strasseri* et *M. arborea*-FAO.

FIGURE 2 : Phenogramme based on the RAPD similarity of 10 plants of *Medicago citrina*, *M. strasseri* and *M. arborea*-FAO.

cient de similarité égal à 100% qui sont eux-mêmes réunis au point de similarité proche de 95%.

Pour tester la variabilité intraspécifique dans *M. strasseri*, deux oligonucléotides (OPB-19 et OPB-20) ont suffi pour obtenir de nombreux produits d'amplification polymorphique. La fréquence moyenne de polymorphisme est de 27,9%. Sa valeur la plus faible de $(1 - F)$, zéro, est observée entre les génotypes 5 et 7 et les génotypes 3 et 8, alors que sa valeur la plus élevée, 50%, est observée entre le génotype 2 et le génotype 9. D'autre part, les plantes 2 et 10 sont génétiquement les plus différentes des autres (figure 2).

2. Caractérisation morphologique

● Caractérisation générale des plantes

On constate qu'avec tous les paramètres analysés en relation avec le port et la taille, aucune différence significative n'est observée entre les trois espèces ($p > 0,05$), à l'exception du nombre de tiges principales qui est différent d'une espèce-

ce à l'autre ($0,001 < p < 0,01$). *M. arborea*-FAO a généralement six tiges par plante, alors que les deux autres espèces en ont seulement 4 ou 5 ($t = 1,60$, NS ; tableau 2). Mais certains détails séparent *M. citrina* des autres; la ramification est plus intense chez cette espèce et les tiges sont de type court et rangées en forme de plume. *M. citrina* développe ses tiges latéralement ; elles peuvent même acquérir une position horizontale, ce qui explique d'ailleurs le diamètre moyen élevé de ses plantes, alors que les deux autres espèces développent leurs tiges en position verticale pour avoir un port érigé.

● Caractérisation de la feuille et de ses appendices

En général, il apparaît des effets hautement significatifs ($p < 0,001$) entre espèces et entre plantes à l'intérieur de l'espèce pour la plupart des caractères étudiés (tableaux 2 et 3). Les trois taxons présentent des feuilles trifoliées, à l'exception de *M. citrina* qui peut avoir des feuilles tétra- ou pentafoiliées. *M. citrina* a par ailleurs des feuilles plus larges qui lui confèrent une meilleure interception de la lumière, améliorant ainsi le rendement photosynthétique. La relation longueur/largeur de la foliole centrale est de 1,48 pour *M. arborea*-FAO et *M. citrina*. *M. arborea*-FAO et *M. strasseri* diffèrent peu du point de vue largeur de la foliole centrale et de la feuille, alors que *M. strasseri* diffère significativement ($p < 0,001$) pour la lon-

Caractères	<i>M. arborea</i> -FAO	<i>M. citrina</i>	<i>M. strasseri</i>
Diamètre D1 (cm)	122,1 ± 20,90	130,8 ± 19,48	127,3 ± 17,68
Diamètre D2 (cm)	127,3 ± 20,19	132,7 ± 18,59	128,4 ± 17,02
Nombre de tiges principales	5,8 ± 0,92	4,2 ± 0,92	4,9 ± 0,99
Hauteur du feuillage (cm)	67,5 ± 11,40	64,3 ± 10,33	62,1 ± 6,14
Hauteur maximale (cm)	89,9 ± 14,40	88,5 ± 12,42	82,0 ± 9,66
Longueur du pétiole (mm)	14,6 ± 1,80	17,7 ± 1,77	16,4 ± 1,84
Longueur du stipule (mm)	4,9 ± 0,61	5,4 ± 0,64	4,3 ± 0,54
Nombre de poils/mm ² foliaire	28,3 ± 2,71	35,6 ± 2,72	26,0 ± 3,56
Longueur de la foliole centrale (mm)	13,0 ± 1,27	17,2 ± 2,16	15,4 ± 2,28
Largeur de la foliole centrale (mm)	8,8 ± 0,94	11,6 ± 1,00	8,3 ± 1,25
Longueur de la feuille (mm)	28,3 ± 2,88	35,4 ± 3,72	32,1 ± 3,53
Largeur de la feuille (mm)	18,1 ± 2,36	23,8 ± 3,18	18,1 ± 0,24
Longueur de la fleur (cm)	1,0 ± 0,08	1,0 ± 0,08	1,18 ± 0,07
Hauteur de l'étendard ouvert (cm)	0,4 ± 0,08	0,6 ± 0,06	0,4 ± 0,03
Nombre de fleurs par pédoncule	9,4 ± 1,69	7,5 ± 1,6	10,4 ± 3,64
Longueur du pédoncule (cm)	1,3 ± 0,31	0,6 ± 0,13	1,7 ± 0,41
Longueur du pédicelle (cm)	0,2 ± 0,04	0,3 ± 0,11	0,3 ± 0,11

TABLEAU 2 : Moyennes des principaux caractères morphologiques pour les espèces évaluées (n = 10 plantes par espèce).

TABLE 2 : Mean values of morphological characters of the three *Medicago* species (n = 10 plants per species).

S.V.	ddl(1)	F(2)	S.V.	ddl(1)	F(2)
Longueur du pétiole (cm)			Longueur de la foliole centrale (cm)		
- Espèce	2	7,39**	- Espèce	2	11,74***
- Plante / espèce	27	3,78***	- Plante / espèce	27	5,81***
- Répétition	270		Hauteur de l'étendard ouvert (cm)		
- Total	299		- Espèce	2	25,65 ***
Formation de poils (poils/mm² foliaire)			- Plante / espèce	25	3,82 ***
- Espèce	2	26,92***	Nombre de fleurs par pédoncule		
- Plante / espèce	27	2,49***	- Espèce	2	3,393 *
			- Plante / espèce	25	13,551 ***

(1) : Le nombre de degrés de liberté (ddl) est de 2 pour l'espèce, 27 pour la plante 270 pour les répétitions, soit au total 299. Dans 2 cas, en raison de valeurs manquantes, il est de 25 pour la plante, 252 pour les répétitions et donc 279 au total.
(2) : *** : significatif à $p < 0,001$; ** : significatif à $0,001 < p < 0,01$; * : significatif à $0,01 < p < 0,05$.
 $F_{\text{espèce}} = \text{CM}_{\text{espèce}} / \text{CM}_{\text{plante(espèce)}}$ dont $ddl_1 = 2$ et $ddl_2 = 270$.
 $F_{\text{plante}} = \text{CM}_{\text{plante(espèce)}} / \text{CM}_{\text{répétition(plante/espèce)}}$ dont $ddl_1 = 27$ et $ddl_2 = 270$.

TABLEAU 3 : Analyse de variance d'un dispositif hiérarchique pour certains caractères de la feuille et de la fleur.

TABLE 3 : Hierarchical analysis of variance for certain leaf and flower characters.

gueur de la foliole centrale, dont le rapport longueur/largeur est de 1,85. ROBLEDO et al. (1993) lors d'une étude antérieure ont enregistré un rapport de 2. En plus des dimensions, *M. strasseri* se distingue bien par l'aspect denté de ses folioles. En général, pour les dimensions de la feuille et ses appendices, *M. citrina* a les valeurs les plus fortes.

La longueur du pétiole augmente significativement ($0,001 < p < 0,01$) de *M. arborea*, *M. strasseri* à *M. citrina* (tableau 2). En fait, la variation due à la plante ($p < 0,001$) est plus importante que celle due à l'espèce ($0,001 < p < 0,01$). Une grande variation est constatée à l'intérieur de *M. citrina*. En effet, le pétiole de cette espèce se distingue non seulement par la longueur mais aussi par la robustesse (diamètre important) et la rigidité (non pliable).

Pour l'ensemble des espèces, les stipules sont adhérentes au pétiole, chacune d'elle ayant la forme d'une moitié de flèche. La longueur de la stipule est aussi connue comme un paramètre distinctif entre les trois espèces. *M. citrina* possède des stipules significativement plus longues que celles de *M. arborea*-FAO et *M. strasseri* ($0,001 < p < 0,01$). Une variation intraspécifique élevée significative ($p < 0,001$) existe également entre les plantes de la même espèce.

L'analyse de la variance (tableau 3) révèle des différences significatives ($p < 0,001$) dans le nombre de poils (face inférieure de la feuille) aussi bien entre espèces qu'à l'intérieur de chaque espèce. En effet, les feuilles de *M. citrina* sont plus poilues (35,55 poils/mm²) que celles de *M. arborea* (28,34 poils/mm²) et de *M.*

strasseri (26,04 poils/mm²). La formation de poils est connue comme critère de classification et varie non seulement d'une espèce à l'autre mais aussi à l'intérieur de l'espèce d'une plante à l'autre (et diminue avec l'âge de la plante). Selon LESINS et LESINS (1979), la présence de poils est un caractère spécifique à *M. arborea*.

L'espèce *M. citrina*, en plus de la supériorité en nombre, développe de longs poils couchés qui couvrent une grande partie de la surface foliaire. Des observations au binoculaire décèlent la coexistence de deux types : poils simples et poils ramifiés (deux poils ayant la même base).

La couche cireuse qui couvre la face supérieure des feuilles caractérise les deux espèces, *M. arborea* et *M. citrina* ; chez cette dernière, la densité de la couche cireuse est plus forte. Les feuilles de *M. strasseri* n'ont pas de couche cireuse, ou tout au plus sous forme de traces. Ce caractère est assez variable d'une plante à l'autre, et varie à l'intérieur d'une même plante en fonction de l'âge et de la position de la feuille.

● Caractérisation morphologique de la fleur

L'inflorescence de ces espèces est pédonculée, le nombre de fleurs par pédoncule est caractéristique de l'espèce ($0,01 < p < 0,05$) et varie aussi d'une plante à l'autre dans la même espèce ($p < 0,001$, tableau 3). En effet, *M. strasseri* a plus de fleurs par pédoncule (10,44) que *M. arborea* (9,44) et que *M. citrina* (7,44). Les plantes d'une même espèce diffèrent significativement ($p < 0,001$) pour ce caractère : le nombre moyen de fleurs par pédoncule varie de 5,7 à 11,1 pour *M. arborea*-FAO, de 5,0 à 9,9 pour *M. citrina* et de 5,3 à 16,6 pour *M. strasseri* (tableau 2). Le nombre de fleurs pourrait être influencé par les conditions de sécheresse. Pour la production fourragère, les gousses peuvent jouer aussi un rôle complémentaire dans la nutrition animale.

La longueur moyenne du pédoncule chez ces espèces est de 1,24 cm mais varie significativement ($p < 0,001$) aussi bien entre espèce qu'à l'intérieur de la même espèce. Le pédicelle est généralement plus long que le tube du calice : sa longueur moyenne est de l'ordre de 0,28 cm mais la variation intraspécifique est plus importante ($p < 0,001$) qu'entre espèces ($0,01 < p < 0,05$).

La longueur moyenne de la fleur de ces espèces est de 1,04 cm et il n'y a aucune différence significative entre les trois espèces ($p > 0,05$), au contraire de ce qui passe à l'intérieur de la même espèce ($p < 0,001$). La hauteur de l'étendard (partie de l'étendard située au-dessus de l'axe de la fleur) est significativement plus importante ($p < 0,001$) chez *M. citrina* (0,60 cm) que chez *M. arborea*-FAO et *M. strasseri* (0,42 et 0,44 cm respectivement). De même, les plantes de la même espèce diffèrent significativement l'une de l'autre pour ce caractère ($p < 0,001$). La différence la plus évidente se situe au niveau des fleurs de *M. citrina* qui possède un étendard quasiment

de la même longueur que le reste des pétales, alors que celles de *M. arborea* et *M. strasseri* ont généralement un étendard plus court que la carène. Cette structure pourrait influencer le pourcentage d'allofécondation par le biais de l'activité des insectes pollinisateurs, les fleurs de *M. arborea* et *M. strasseri* étant plus accessibles aux insectes.

● Analyse des groupes

Le calcul de S_{ij} est effectué en considérant l'ensemble des 13 caractères introduits dans la caractérisation morphologique. Sur cette base, les valeurs de similarité moyenne intraspécifique ne sont pas largement différentes. En effet, leurs valeurs sont estimées à 93,10% pour *M. arborea*-FAO, 92,29% pour *M. citrina* et 91,02% pour *M. strasseri*, alors que les valeurs entre espèces sont respectivement de 85,40%, 89,64% et 83,97% pour les couples *M. arborea* - *M. citrina*, *M. arborea*-FAO - *M. strasseri* et *M. citrina* - *M. strasseri*.

M. strasseri est caractérisée par une variation morphologique relativement plus importante (% variation = (1 - similarité) x 100). La valeur la plus élevée de similarité morphologique interspécifique est observée entre *M. arborea*-FAO et *M. strasseri*.

Le regroupement des 30 plantes selon leur similarité est effectué par ordre décroissant en commençant par relier les individus présentant le pourcentage le plus élevé de similarité (méthode de "linkage" moyen) ; au fur et à mesure que le pourcentage diminue, le nombre de groupes décroît et davantage d'individus sont réunis. Au niveau 100% de similarité, toutes les plantes sont différentes. Le point le plus critique du dendrogramme (figure 3) est le niveau 85% de similarité : toutes les plantes sont groupées dans un sous-groupe ou dans un autre (aucune plante non groupée) et on distingue trois principaux sous-groupes, un premier formé par les 10 plantes de *M. citrina*, un autre est constitué en majorité par les plantes de *M. arborea*-FAO et seulement deux plantes de *M. strasseri* (s10 et s3), enfin un troisième presque entièrement constitué des plantes de *M. strasseri* (à l'ex-

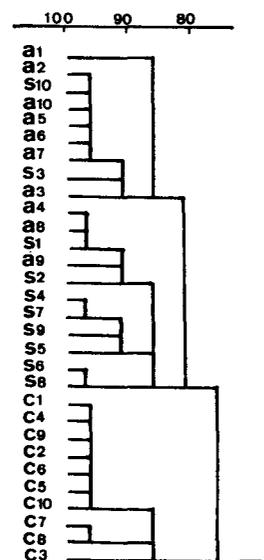


FIGURE 3 : Dendrogramme des 30 plantes de *Medicago citrina* (c), *M. strasseri* (s), et *M. arborea*-FAO (a) basé sur les données morphologiques.

FIGURE 3 : Dendrogramme of 30 plants of *Medicago citrina* (c), *M. strasseri* (s), et *M. arborea*-FAO (a), based on the morphological data.

ception de trois plantes de *M. arborea*-FAO : a4, a8 et a9). Dans le groupe suivant (80% de similarité), les plantes de *M. arborea*-FAO et celles de *M. strasseri* sont rassemblées dans le même groupe ; pour un taux de similarité morphologique de 75%, toutes les plantes entrent dans un groupe unique.

Pour conclure, une certaine variabilité ($1-S_{ij}$) morphologique interspécifique, malgré tout relativement faible, existe pour les caractères étudiés ; elle est de l'ordre de 15% entre les trois espèces et de 20% entre le premier groupe formé par *M. arborea*-FAO et *M. strasseri* et l'autre formé par *M. citrina*. Par rapport aux résultats du RAPD, on constate que la plante n°1 de *M. arborea*-FAO est toujours différente des autres. En revanche, les plantes n°2 et 10 de *M. strasseri* appartiennent à différents groupes selon RAPD, alors qu'elles sont réunies avec celles de *M. arborea*-FAO au vu du test de similarité.

● Analyse des principaux composants de la variation morphologique

L'étude de ces caractères et leur expression nous ont conduits à proposer quatre principaux groupes qui couvrent presque la totalité de la variation morphologique (99,78%) ; cette variation est distribuée par ordre décroissant du 1^{er} au 4^e composant principal (tableau 4) et varie respectivement de 74,6%, 19,0%, 5,0% à

Caractères	Composants principaux			
	1	2	3	4
Diamètre trans-ligne (D2)	-0,90910	-0,41425	-0,02895	0,03374
Nombre de tiges principales	-0,01258	0,01824	0,09984	0,03550
Hauteur maximale	-0,41422	0,89919	0,13569	-0,01332
Longueur du pétiole	-0,00221	-0,00422	-0,01394	-0,01072
Longueur de stipules	-0,00155	0,00075	-0,00505	-0,00320
Nombre de poils	-0,03851	0,12602	-0,95117	-0,24435
Longueur de la foliole centrale	-0,00411	-0,00334	-0,01775	-0,00407
Largeur de la foliole centrale	-0,00206	-0,00012	-0,02157	0,00106
Longueur de la fleur	0,00063	-0,00207	0,00100	-0,00700
Hauteur de l'étendard ouvert	-0,00040	-0,00035	-0,01432	0,00644
Nombre de fleurs par pédoncule	-0,01660	-0,05836	0,24367	-0,96769
Longueur du pédoncule	0,00296	-0,01374	0,07480	0,03256
Longueur du pédicelle	-0,00113	-0,00336	0,00056	-0,00028
Variation exprimée (%)	74,61	19,03	5,01	1,13

TABLEAU 4 : Coefficients des caractères morphologiques correspondant à chaque principal composant de variation.

TABLE 4 : Coefficients of morphological characters corresponding to each main component of the variability.

1,1%. Dans le premier composant, les coefficients les plus élevés (en valeur absolue) correspondent aux caractères “diamètre des plants D2” et “hauteur maximale” : ces caractères constituent donc la source de variation la plus forte. Concernant les quatre premiers composants principaux (1, 2, 3 et 4), les coefficients sont aussi élevés pour le “nombre de poils” que pour le “nombre de fleurs par pédoncule”.

Discussion

Bien que notre étude porte sur des espèces ayant une large distinction taxonomique, un **niveau relativement faible de polymorphisme génétique** a été détecté comparé à celui observé chez d'autres espèces telles que le maïs (TAO et al., 1993).

La comparaison du nombre total de bandes au nombre de bandes polymorphes obtenues avec des oligonucléotides spécifiques démontre que les amorces diffèrent par leur capacité à détecter le polymorphisme de l'ADN. Ceci suppose qu'il est possible d'identifier un ensemble d'amorces qui amplifient les régions les plus variables du génome (TAO et al., 1993). En pratique, **la séparation de deux écotypes régionaux est possible par une simple amorce** (exemple OPB-16).

Avec les RAPD il est possible de mettre en évidence les similarités au sein d'une gamme de génotypes présentant une base de bandes partagées. L'analyse quantitative des RAPD a produit **des matrices de similarité génétique qui sont en concordance avec les classifications** basées sur des caractères morphologiques et agronomiques. TAO et al. (1993) rapportent que le phénogramme produit à l'aide des RAPD pour des génotypes de sorgho montrait une certaine analogie avec des déterminations morphologiques antérieures.

Dans notre étude, l'évaluation des espèces pour certains caractères comme la morphologie de la feuille ou de la fleur constitue un bon outil pour la distinction des taxons. En fait, pour la plupart des caractères évalués, *M. strasseri* et *M. arborea*-Grèce ont montré de **grandes similarités et toutes deux s'écartent suffisamment de *M. arborea*-FAO, alors que *M. citrina* constitue un groupe parfaitement distinct**. L'origine géographique pourrait avoir un effet important sur la similarité génétique sans considérer les similarités morphologiques apparentes (TAO et al., 1993). En d'autres termes, *M. strasseri* et *M. arborea*-Grèce sont deux espèces originaires de la zone méditerranéenne orientale (Grèce), condition suffisante pour que les deux espèces acquièrent des caractéristiques communes, et qui laisse penser à une parenté possible bien que l'une soit tétraploïde et l'autre probablement diploïde. LESINS et LESINS (1979), en étudiant les mécanismes d'isolement dans le genre *Medicago*, confirment l'existence de cas où les similarités morphologiques entre taxons sont tellement évidentes qu'on n'a aucun doute sur leur proximité génétique (c'est le cas de *M. murex* $2n=16$ et $2n=14$).

La variation intraspécifique détectée dans ce travail par RAPD pourrait être due en partie à l'**allogamie prédominante chez ces espèces** (LESINS et LESINS, 1979 ; AYAT et MANSAT, 1987) et à leur multiplication par semences résultant de fécondation croisée. Ce résultat est en accord avec ceux de KAZAN et al. (1993) sur le *Stylosanthes guianensis* (légumineuse) et aussi avec d'autres études qui relient l'augmentation de la diversité génétique avec le taux d'allogamie (MILLER et TANKSLEY, 1990).

ROBLEDO et al. (1993), lors des déterminations préliminaires de la variabilité morphologique, ont suggéré une variation intraspécifique plus prononcée chez *M. arborea*-FAO qu'à l'intérieur des deux autres espèces. Une constatation qui est confirmée partiellement par nos résultats. D'autre part, *M. arborea* est l'unique espèce ligneuse cultivée depuis longtemps et a subi différentes adaptations aux milieux où elle a été introduite : elle aurait développé des génotypes à bases génétiques différentes. Le fait que *M. citrina* croisse dans des îles, espace relativement limité et isolé, est probablement le principal facteur responsable d'une variation intraspécifique réduite.

Les résultats confirment l'**utilité de la technique RAPD** pour mettre en évidence le polymorphisme de l'ADN de certaines espèces ou accessions ligneuses du genre *Medicago*. Son usage pour l'amélioration de ce groupe d'espèces dépendra de sa capacité à accélérer les procédures de sélection. Il est important d'approfondir les travaux basés sur la technique RAPD pour détecter avec certitude le polymorphisme existant entre et à l'intérieur des populations et essayer d'analyser la concordance avec les différences agronomiques observées entre populations ou plantes de la même espèce.

La technique RAPD a permis de détecter **davantage de variabilité génétique dans *M. arborea*-FAO que dans *M. strasseri* et une très faible variation génétique dans *M. citrina***. De plus, *M. arborea*-FAO et *M. strasseri* sont génétiquement plus proches, chose que confirment les déterminations morphologiques. Pour un certain niveau de similarité génétique, *M. strasseri* est celle qui se rapproche le plus de *M. citrina* (si on exclut *M. arborea*-Grèce).

Globalement, les **pourcentages de similarité morphologique intra et interspécifique sont plus élevés que ceux de la similarité génétique** (à l'exception de *M. citrina* où ces pourcentages sont proches). Cette remarque pose la question de l'intérêt d'appliquer l'une et/ou l'autre méthode pour l'évaluation intra et interpopulation, tout en prenant en compte le temps et le coût nécessaires à leur mise en oeuvre.

Accepté pour publication, le 2 avril 1995.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AYAT N., MANSAT P. (1987) : "Premiers résultats sur la variabilité de *M. arborea* (L.)", *FAO-European Cooperative Network on pasture and fodder crop production, Sub-network on Mediterranean Pastures 5th meeting*, Bull. n°5, 56-66.
- BOLÒS O., VIGO J. (1974) : *Boletín Inst. Catalana Historia Natural*, 38, 69.
- BOLÒS O., VIGO J. (1984) : *Flora del Paísos Catalans*, vol.1 (ed. Barcino, Barcelona).
- CENIS J.L. (1992) : "Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification", *Nucleic Acids Research*, 20, 2380.
- COSTE H. (1906) : *Flore descriptive et illustrée de la France*, vol. 3, Librairie Sc.Tech.A., Blanchard-Paris.
- FONT-QUER P. (1924) : "Formes noves de plantes", *Memòries Museu Ciències Naturals Barcelona, Sèrie botànica*, 1(2), Barcelona.
- GREUTER W., MATTHÄS U., RISSE H. (1982) : "Notes on Cardaegan plants. 3-*Medicago strasserii*, a new leguminous shrub from Kriti", *Willdenowia*, 12, 201-206.
- GREUTER W. (1986) : *Willdenowia*, 16, 112.
- GREUTER W., BURDET H.M., LONG L. (1989) : *Med-checklist*, vol. 4, Dicotyledons (Lauraceae-Rhamnaceae), Conservatoire et jardin botanique de Genève (Suisse).
- KAZAN K., MANNERS J.M., CAMERON D.F. (1993) : "Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers", *Theor. Appl. Genet.*, 85, 882-888.
- LESINS K.A., LESINS I. (1979) : *Genus Medicago (Leguminosae): A taxogenetic study*, Junk W. ed., 228 p, The Hague, Netherlands.
- MILLER J.C., TANKSLEY S.D. (1990) : "RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*", *Theor. Appl. Genet.*, 80, 437-448.
- NEI M., LI W. (1979) : "Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 5269-5273.
- PATERSON A.H., TANKSLEY S.D., SORELLS M.E. (1991) : "DNA markers in plant improvement", *Adv. Agron.*, 46, 39-90.
- POLHILL R. M., RAVEN P.H., STIRTON C.H. (1981) : "Evolution and systematics of Leguminosae", *Advance in legume systematic*, Polhill R.M. and Raven P.H. eds., pp 1-6.
- PIGNATTI S. (1982) : *Flora d'Italia*, vol. 1, ed. Edagricole, Bologna.
- RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. (1993) : "Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines", *Trends in Genetics*, 9, 275-280.
- ROBLEDO A., RIOS S., CORREAL E. (1993) "Genetic variability of the Medic group in the Mediterranean Basin", *7th Meeting of the FAO European Sub-Network on Mediterranean pastures and fodder crops*, pp 91-94, Mediterranean Agronomic Institute of Chania, Grèce.
- ROHLF F.J. (1988) : *NTSys-pc, Numerical taxonomy system for the IBM PC microcomputer (and compatibles) version 1.4 Manual*, Biostatistic Inc., Setauket, New York-USA,
- TAO Y., MANNERS J.M., LUDLOW M.M., HENZELL R.G. (1993) : "DNA polymorphisms in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)", *Theor. Appl. Genet.*, 86, 679-688.

- VILLAX E.J. (1963) : "La culture des plantes fourragères dans la région méditerranéenne occidentale (Maroc, Portugal, Tunisie, Algérie, Espagne et France)", *Les cahiers de la Recherche Agronomique*, 17, INRA Rabat (Maroc).
- WAUGH R., POWELL W. (1993) : "Using RAPD markers for crop improvement", *Tibtech*, 10, 186-191.
- WELSH J., MCCLELLAND M. (1991) : "Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers", *Nucleic Acids Reserch*, 19, 861-866.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. (1990) : "DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", *Nucleic Acid Research*, 18, 6531-6535.

RÉSUMÉ

Au cours des dernières années, l'existence de trois espèces pérennes ligneuses du genre *Medicago* a été reconnue : *M. arborea*, *M. citrina* et *M. strasseri*. La caractérisation morphologique et l'étude moléculaire (marqueurs moléculaires) qui constituent l'objectif de cette étude ont permis de distinguer les taxons et de détecter la variabilité intraspécifique. *M. arborea* et *M. strasseri* sont génétiquement proches alors que *M. citrina* est une espèce parfaitement distincte. La comparaison des résultats obtenus par l'un et l'autre système d'évaluation confirme l'intérêt respectif des deux méthodes pour détecter la variabilité inter et intraspécifique.

SUMMARY

Morphological and molecular characters for the differentiation of woody species within the genus Medicago

Beside tree medick (*Medicago arborea*), two other legumes have been recognized as woody species (shrubs) : *Medicago strasseri* and *M. citrina*. A molecular study (RAPD), with the help of morphological characters (leaves, flowers, stems...) has shown that it exists large differences between the three taxa, but also intra-specific variability. Generally, *M. arborea* and *M. strasseri* seem to be more closely related to each other than to *M. citrina*, which appears to be very different. The comparison of the results of the morphological and of the molecular methods shows that both are of interest for the detection of inter- and intra-specific variability, and that they are complementary for the differentiation of the three taxa.